

# **MOLEKULARGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR SYSTEMISCHEN PROGRESSION MALIGNER MELANOME**



**DISSERTATION**

**ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN**

**(Dr. rer. nat.)**

**DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN**

**DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

vorgelegt von

**Isabelle Rosa Hodak (geb. May)**

aus Bottrop

im Jahr

2015

Die vorliegende praktische Arbeit entstand im Zeitraum von Januar 2005 bis Januar 2008 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Christoph A. Klein am Lehrstuhl für Experimentelle Medizin und Therapieverfahren am Klinikum der Universität Regensburg.

**Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:** 21.05.2015

**Die Arbeit wurde angeleitet von:** Prof. Dr. med. Christoph A. Klein

**Unterschrift:**

**Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:**

Ulmer A, Dietz K, **Hodak I**, Polzer B, Scheitler S, Yildiz M, Czyz Z, Lehnert P, Fehm T, Hafner C, Schanz S, Röcken M, Garbe C, Breuninger H, Fierlbeck G, Klein CA (2014). **Quantitative measurement of melanoma spread in sentinel lymph nodes and survival.** PLoS Med. 2014 Feb 18;11(2):e1001604. PMID: 24558354

---

### **Prüfungsausschuss:**

**Vorsitzender:**

Herr Prof. Dr. Reinhard Wirth

**1. Gutachter (1. Prüfer):**

Herr Prof. Dr. Stephan Schneuwly

**2. Gutachter (2. Prüfer):**

Herr Prof. Dr. med. Christoph A. Klein

**3. Prüfer:**

Herr Prof. Dr. Richard Warth

---

---

**Für  
Damir,  
Lea, Mara und Mila**

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das Maligne Melanom .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Definition .....	1
1.1.2 Epidemiologie und Inzidenz des malignen Melanoms .....	1
1.1.3 Histopathologie und Entwicklung des kutanen Melanoms .....	3
1.1.4 Diagnostik, Therapie und Nachsorge .....	6
<b>1.2 Genomische und molekulare Veränderungen im malignem Melanom .....</b>	<b>9</b>
1.2.1 MAPK- und PI3K-AKT-Signaltransduktionsweg .....	10
1.2.1.1 Die Onkogene N-RAS und B-RAF .....	14
1.2.1.2 ERK Signalweg .....	15
<b>1.3 Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>17</b>
<b>2. Material .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Verwendete Materialien .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Kooperationspartner und Patientenkollektiv .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3 SI Einheiten und Anglizismen .....</b>	<b>24</b>
<b>3. Methoden .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Gewinnung von Patienten Proben .....</b>	<b>25</b>
3.1.1 Gewinnung von disseminierten Melanom-Einzelzellen .....	25
3.1.1.1 Aufarbeitung der Wächterlymphknoten .....	25
3.1.1.2 Isolierung von Melanom-Einzelzellen .....	26
3.1.2 Gewinnung von Primärtumoren und Metastasen .....	27
3.1.2.1 Schnitte und immunhistochemische Färbung von Primärtumoren und Metastasen .....	27
3.1.2.2 Mikodissektion von Arealen .....	28
3.1.2.3 Kontroll-Zellen .....	28
3.1.3 Primäre PCR .....	28
3.1.4 Kontroll-PCR .....	30
3.1.5 Gelelektrophorese .....	31
<b>3.2 Komparative Genomische Hybridisierung (CGH) .....</b>	<b>31</b>

3.2.1	Metaphasen-Präparation .....	33
3.2.2	Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) .....	34
3.2.3	Auswertung der CGH.....	36
3.2.4	Hierarchische Cluster-Analyse.....	38
<b>3.3</b>	<b>Mutationsanalyse mittels der SSCP-Analyse.....</b>	<b>39</b>
3.3.1	Template spezifische PCR.....	39
3.3.2	SSCP-Analyse .....	41
3.3.3	Gelelektrophorese und Validierung der SSCP .....	42
<b>3.4</b>	<b>DNA-Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese.....</b>	<b>45</b>
<b>3.5</b>	<b>Quantifizierung von DNA.....</b>	<b>48</b>
3.5.1	qPCR Durchführung.....	50
3.5.3.1	qPCR der DTC-Proben .....	51
3.5.3.2	qPCR Auswertung .....	52
<b>3.6</b>	<b>Statistische Berechnungen .....</b>	<b>54</b>
3.6.1	Exakter Test.....	54
3.6.2	Nicht-parametrische Tests .....	54
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b>Immunzytochemischer Nachweis und Isolierung von Tumorzellen .....</b>	<b>56</b>
4.1.1	Gewinnung von disseminierten Tumoreinzellen .....	56
4.1.2	Gewinnung von Primärtumor- und Metastasen-Arealen .....	57
4.1.3	Gewonnenes Probenkollektiv .....	58
<b>4.2</b>	<b>Identifizierung geteilter und charakteristischer Genomveränderungen des malignem Melanoms .....</b>	<b>61</b>
4.2.1	Probenkollektiv für die CGH-Analysen .....	61
4.2.2	Chromosomale Veränderungen des malignen Melanoms.....	63
4.2.3	Ähnlichkeitsanalyse zwischen den Melanom Tumortypen.....	70
4.2.3.1	Genomischer Vergleich von Primärtumoren und disseminierten Tumoreinzellen desselben Patienten .....	72
4.2.3.2	Ähnlichkeitsanalyse der Metastasen .....	77
<b>4.3</b>	<b>Molekulargenetische Charakterisierung der Onkogene B-RAF und N-RAS im malignem Melanom.....</b>	<b>78</b>
4.3.1	SSCP-Etablierung für die Onkogene B-RAF und N-RAS .....	78
4.3.1.1	SSCP für das Onkogen B-RAF .....	80
4.3.1.2	SSCP für das Onkogen N-RAS.....	83
4.3.2	Mutationsvorkommen der Onkogene B-RAF und N-RAS.....	86



4.3.3	Mutationsvorkommen in den PT/DTC-Paaren .....	90
<b>4.4</b>	<b>Quantifizierung von Cyclin D1 in den disseminierten Tumor Einzelzellen .....</b>	<b>92</b>
4.4.1	Zielgen und Referenzgene .....	92
4.4.2	Cyclin D1 Amplifikation in disseminierten Tumor Einzelzellen.....	94
4.4.3	Cyclin D1, B-RAF und N-RAS .....	96
<b>4.5</b>	<b>Klinische Parameter und molekulare Evolution beim Melanom.....</b>	<b>96</b>
4.5.1	Analysen zu den Histologie-Subtypen .....	97
4.5.1.1	Chromosomale Veränderungen in den Histologie-Subtypen .....	97
4.5.1.2	B-RAF, N-RAS und Cyclin D1 in den Histologie-Subtypen.....	103
4.5.2	Analysen zu den klinischen Parametern der Patienten .....	105
4.5.2.1	Korrelation zwischen klinischen Parametern und genomischen Veränderungen .....	105
4.5.2.2	Korrelation zwischen klinischen Parametern und Onkogenen .....	107
<b>4.6</b>	<b>PT→DTC→Met: die Progression eines Patienten .....</b>	<b>109</b>
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>111</b>
5.1	Primärtumore und disseminierte Tumoreinzelzellen des malignen Melanoms divergieren auf chromosomaler Ebene .....	111
5.2	Akkumulation genomischer Veränderungen im Verlauf der Zeit.....	114
5.3	Die Analyse der systemischen Progression maligner Melanome.....	118
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>126</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>129</b>
<b>8.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>143</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>144</b>
<b>10.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>146</b>
10.1	Patientenkollektiv .....	146
10.2	Ausführliche ErgebnissTabellen.....	149
10.3	Abbildungen.....	169
10.3.1	CGH-Ideogramme .....	169
10.3.2	CGH-Profile des Melanom Kollektivs .....	173
10.3.3	CGH-Profile der Kontrollen .....	184

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung des RAS-RAF-MEK-ERK (MAPK)-Signaltransduktionsweges .....	12
Abbildung 2:	Schematische Darstellung des PI3K-AKT-Signaltransduktionsweges .....	13
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Fragestellung .....	18
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der Disseminierung von Tumorzellen via Lymphbahn in den SLN .....	25
Abbildung 5:	Gelelektrophoresebild einer Kontroll-PCR von Metastasen-Proben .....	31
Abbildung 6:	Prinzip der komparativen genomischen Hybridisierung .....	32
Abbildung 7:	Beispiel eines internen Fragment-Test. ....	40
Abbildung 8:	Darstellung der SSCP-Analyse.....	42
Abbildung 9:	Validierungsbeispiel der SSCP-Gelelektrophorese von N-RAS Codon 61.....	44
Abbildung 10:	Experimentelles Vorgehen.....	55
Abbildung 11:	Mikromanipulator-assistierte Isolation von einer HMB45-positiven DTC .....	56
Abbildung 12:	Mikrodissektion von einem Primärtumor.....	57
Abbildung 13:	Mikrodissektion von einer Metastase.....	57
Abbildung 14:	Anzahl des Patienten- und Probenkollektivs in den einzelnen Tumortypen (PT, DTC, Met) .....	59
Abbildung 15:	Balanciertes und aberrantes CGH-Profil.....	62
Abbildung 16:	Histoplot Bilder der PT, DTC und der Metastasen des gesamten Kollektivs .....	65
Abbildung 17:	Schnittmengen von Chromosomenregionen zwischen PT, DTC und Met .....	65
Abbildung 18:	Histoplot Bilder von DTC aus pN0 und pN1 .....	68
Abbildung 19:	Chromosomalen Veränderungen in den DTC aus pN0- und pN1-Stadium .....	69
Abbildung 20:	Hierarchische Clusteranalyse des gesamten CGH-Probenkollektivs .....	71
Abbildung 21:	Dendrogramme der Clusteranalyse des gesamten CGH-Probenkollektivs .....	72
Abbildung 22:	Chromosomale Veränderungen in den PT/DTC-Paaren .....	73
Abbildung 23:	Hierarchische Cluster-Analyse der PT/DTC-Paare.....	75
Abbildung 24:	Dendrogramm der PT/DTC-Paare.....	76
Abbildung 25:	Hierarchische Cluster-Analyse der Metastasen Proben.....	77
Abbildung 26:	SSCP-Gel und Sequenz-Chromatogramm für das Onkogen B-RAF .....	81
Abbildung 27:	SSCP-Gel und Sequenz-Chromatogramm von B-RAF p.V600E* .....	82
Abbildung 28:	SSCP-Gel und Sequenz-Chromatogramm von B-RAF p.V600K.....	82
Abbildung 29:	SSCP-Gel und Sequenz-Chromatogramm von N-RAS (Codon 61) .....	84
Abbildung 30:	N-RAS Codon 12/13 .....	86
Abbildung 31:	Heterogenität und Mutationsvorkommen von B-RAF und N-RAS. ....	89
Abbildung 32:	Mutationsvorkommen für PT und DTC in den PT/DTC-Paaren.....	91
Abbildung 33:	CGH-Ideogramm der Chromosomenregion 11q13 .....	93
Abbildung 34:	Beispiel einer Standardkurve des Referenzgens RUFY2.....	94
Abbildung 35:	Histoplot Bilder der superfiziell spreitenden Melanome.....	98
Abbildung 36:	Histoplot-Bilder der nodulären Melanome und der akrolentiginösen Melanome.....	100

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 37:	Dendrogramm der PT/DTC-Paare und deren Histologie.....	101
Abbildung 38:	Hierarchische Cluster-Analyse der gesamten SSM Proben .....	103
Abbildung 39:	Ähnlichkeitsanalyse der PT/DTC-Paare nach klinischen Parametern.....	106
Abbildung 40:	Cluster Ausschnitt der Gruppierung aus Abbildung 39. ....	107
Abbildung 41:	Hierarchische Cluster-Analyse der Progression.....	109
Abbildung 42:	Auswertung der Onkogene und des Cyclin D1 in der PT/DTC/Met-Triplet Gruppe .....	110
Abbildung 43:	Frühe Disseminierung zwischen PT und DTC.....	119
Abbildung 44:	Expansion in den Lymphknoten .....	121
Abbildung 45:	Hypothetisches Progressionsmodell zur systemischen Progression maligner Melanome .....	124
Abbildung 46:	Ideogramm der PT (n=28).....	169
Abbildung 47:	Ideogramm der DTC (n=44; inkl. NP) .....	170
Abbildung 48:	Ideogramm der Metastasen (n=9).....	170
Abbildung 49:	Ideogramm DTC der Paare (n=23, inkl. NP) .....	171
Abbildung 50:	Ideogramm der PT-Paare (n=23) .....	171
Abbildung 51:	Ideogramm der DTC pN0 (n=32; inkl. NP) .....	172
Abbildung 52:	Ideogramm der DTC pN1 (n=12; inkl. NP) .....	172

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht über die verzeichneten Mutationen in sporadischen Melanom Fällen .....	10
Tabelle 2:	Verwendete Oligonukleotide (Primer).....	22
Tabelle 3:	Positiv- und negativ-Kontrollen für die SSCP-Gelelektrophorese bekannter Sequenz. ....	44
Tabelle 4:	Sequenz Symbole.....	48
Tabelle 5:	Wobble IUPAC-IUB Symbole.....	48
Tabelle 6:	Referenzgene für die qPCR .....	49
Tabelle 7:	Verwendete Annealingtemperatur und die Fragmentgröße der Referenzgene.....	50
Tabelle 8:	Einteilung des Patientenkollektives in Untergruppen .....	60
Tabelle 9:	Anzahl der CGH-Profile .....	63
Tabelle 10:	Prozentuales Vorkommen von aberranten Chromosomenregionen in den Tumortypen.....	66
Tabelle 11:	Zusammenfassung der mittleren Anzahl der genetischen Veränderungen des gesamten CGH-Probenkollektivs.....	67
Tabelle 12:	Auffällige Chromosomenregionen in den Gruppen A (PT) und B (DTC) der PT/DTC-Paare .....	76
Tabelle 13:	Anzahl der durchgeführten SSCP-Proben für die Mutations Analyse B-RAF und N-RAS.....	79
Tabelle 14:	Vergleich der B-RAF Ergebnisse von SSCP und Sequenzierung.....	83
Tabelle 15:	Vergleich der N-RAS Ergebnisse von SSCP und Sequenzierung .....	85
Tabelle 16:	Ergebnisse von B-RAF und N-RAS im gesamten Kollektiv.....	87
Tabelle 17:	B-RAF- und N-RAS-Mutationen in den Metastasen-Proben .....	88
Tabelle 18:	Ergebnisse von B-RAF und N-RAS in den PT/DTC-Paaren.....	90
Tabelle 19:	Anzahl der Deletionen und Amplifikationen der DTC- und PT-Proben in speziellen Chromosomenregionen.....	92
Tabelle 20:	Übersicht der Referenzgene .....	94
Tabelle 21:	Ergebnisse der Cyclin D1 qPCR der DTC.....	95
Tabelle 22:	Vergleich zwischen den Ergebnissen der CGH (11q13) und qPCR (Cyclin D1) .....	95
Tabelle 23:	Vergleich zwischen B-RAF, N-RAS und CCND1 in den DTC Proben .....	96
Tabelle 24:	Anzahl der CGH-Profile in den Histologie-Subtypen .....	97
Tabelle 25:	Zusammenfassung der Aberrationen-Anzahl des SSM-Probenkollektivs.....	99
Tabelle 26:	Probenanzahl in den Histologie-Subtypen der PT/DTC-Paare.....	102
Tabelle 27:	Mutationsvorkommen von B-RAF und N-RAS in den Histologie Subtypen.....	104
Tabelle 28:	Übersicht der p-Werte in den Histologie-Subtypen.....	104
Tabelle 29:	Cyclin D1 Amplifikation in den DTC der Histologie-Subtypen.....	105
Tabelle 30:	Korrelation von Ulzeration mit der B-RAF Mutation .....	107
Tabelle 31:	Korrelation von Alter und Tumordicke mit der N-RAS Mutation .....	108
Tabelle 32:	Kandidatengene mit einer möglichen Rolle beim malignem Melanom .....	113
Tabelle 33:	Invasionslevel nach Clark .....	146
Tabelle 34:	Patientendaten Teil 1 (Geschlecht, Alter, Breslow, TNM, Histologie und Lokalisation).....	146

## Tabellenverzeichnis

---

<i>Tabelle 35:</i>	<i>Patientendaten Teil 2 (Clark Level, Curtin, Regression, Ulzeration und Pathologie) .....</i>	<i>147</i>
<i>Tabelle 36:</i>	<i>Anzahl der isolierten Einzelzellen und Areale .....</i>	<i>149</i>
<i>Tabelle 37:</i>	<i>Liste der Zellzahlen der SLN bei den einzelnen Färbungen .....</i>	<i>150</i>
<i>Tabelle 38:</i>	<i>Komplettes prozentuales Vorkommen von aberranten Chromosomenregionen in den Tumortypen .</i> <i>.....</i>	<i>151</i>
<i>Tabelle 39:</i>	<i>Aberrationenanzahl der CGH-Profile pro Probe.....</i>	<i>152</i>
<i>Tabelle 40:</i>	<i>SSCP Ergebnisse der Onkogene B-RAF und N-RAS in allen Proben .....</i>	<i>153</i>
<i>Tabelle 41:</i>	<i>Kombinationen zwischen PT und DTC der PT/DTC-Paare. ....</i>	<i>157</i>
<i>Tabelle 42:</i>	<i>Cyclin D1 Ergebnisse der qPCR.....</i>	<i>157</i>
<i>Tabelle 43:</i>	<i>B-RAF, N-RAS und Cyclin D1 in den Histologie-Subtypen.....</i>	<i>160</i>
<i>Tabelle 44:</i>	<i>Mutationsvorkommen von B-RAF und N-RAS in den SSM .....</i>	<i>162</i>
<i>Tabelle 45:</i>	<i>Mutationsvorkommen von B-RAF und N-RAS in den NM .....</i>	<i>163</i>
<i>Tabelle 46:</i>	<i>Mutationsvorkommen von B-RAF und N-RAS in den ALM. ....</i>	<i>164</i>
<i>Tabelle 47:</i>	<i>Auswertung der B-RAF und N-RAS Ergebnisse für die Triplet-Gruppe. ....</i>	<i>165</i>
<i>Tabelle 48:</i>	<i>Die B-RAF-Mutation in den klinischen Parametern von PT, DTC und Met.....</i>	<i>165</i>
<i>Tabelle 49:</i>	<i>Die N-RAS Mutation in den klinischen Parametern von PT, DTC und Met.....</i>	<i>166</i>
<i>Tabelle 50:</i>	<i>Cyclin D1 Amplifikation in den klinischen Parametern der DTC.....</i>	<i>168</i>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AK	Antikörper
ALM	Akrolentiginöses Melanom
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Bromo-4-chlor-3-indolylphosphat-p-toluinsalz
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CGH	comparative genomic hybridization
CK	Zytokeratin
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DAPI	4', 6-Diamidino-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
DCCD	engl. Disseminated Cancer Cell Density
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2-Desoxy-Ribonukleotidtriphosphat
Dig	Digoxigenin
DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
dsDNA	doppelsträngige-Desoxyribonukleinsäure
DTC	disseminierte Tumoreinzelle (= im engl. DCC, disseminated cancer cell)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung (1g = 9,81m/s <sup>2</sup> )
G	Guanin
H <sub>2</sub> O	Wasser
H/E	Hämatoxylin/Eosin
K	Kontrolle
LMM	Lentigo maligna Melanom
LN	Lymphknoten (engl. lymph node)
LOH	engl. loss of heterozygosity
m	männlich

## Abkürzungsverzeichnis

---

mAk	monoklonaler Antikörper
mere	Stück
Met	Metastase
MOPC	Mouse Oocyte Plasmocytom
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NM	Noduläres Melanom
PBMC	humane periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFS	median progression-free survival - progressionsfreies Überleben
PHA	Phytohämagglutinin
PL	primäre Läsion
PT	Primärtumor
RNA	Ribonukleinsäure
RGP	radial growth phase
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raum Temperatur
SNB	sentinel node biopsy (Wächterlymphknoten Biopsie)
SLN	sentinel lymph node (Wächterlymphknoten)
SSCP	single strand conformation polymorphism
ssDNA	einzelsträngige-Desoxyribonukleinsäure
SSM	superfiziell spreitendes Melanom
T	Thymin
TE	Tris-EDTA Puffer
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
UV	Ultraviolett
VGP	vertical growth phase
v/v	Volumen pro Volumen
vs.	gegen
w	weiblich
w/v	Gewicht pro Volumen
x	Multiplikator





# 1. Einleitung

## 1.1 Das Maligne Melanom

In einem gesunden Organismus stehen spezialisierte Zellen in einem Gleichgewicht aus Proliferation und Apoptose (Zelltod). Dabei generieren die sogenannten Stammzellen Nachkommen, die frühere Generation ersetzen. Wird dieses Gleichgewicht zerstört, kommt es zur unkontrollierten Proliferation von Zellen und damit zur Tumorentstehung. Während Zellen eines benignen Tumors ihre ursprünglichen Grenzen beibehalten, wachsen Zellen eines malignen Tumors invasiv, d.h. in benachbarte Gewebe und Strukturen ein. Durch die Fähigkeit maligner Tumore Metastasen über Blut- und Lymphbahnen abzusiedeln, können auch entfernte Organe befallen werden.

### 1.1.1 Definition

Das maligne Melanom, auch schwarzer Hautkrebs genannt, ist ein hochgradig bösartiger Tumor der Melanozyten (Pigmentzellen) und manifestiert sich überwiegend an der Haut. Die Hauptmerkmale des malignen Melanoms sind eine tiefbraune bis schwarze Färbung mit unterschiedlicher Pigmentierung, asymmetrischer Form und unregelmäßigen Rändern. Die Größenzunahme erfolgt zunächst durch ein horizontales Wachstum. Nach einem variablen Zeitraum findet man eine palpable Elevation und die Tendenz zum vertikalen Wachstum. Im Verhältnis zur Tumormasse besteht beim malignen Melanom eine frühe Tendenz zur Metastasierung und damit eine ungünstige Prognose für den Patienten. Das maligne Melanom ist der Hautkrebs mit der höchsten Metastasierungsrate und verantwortlich für 90 % der Mortalität an Hauttumoren (Robert Koch Institut, 2012).

### 1.1.2 Epidemiologie und Inzidenz des malignen Melanoms

Das Lebenszeitrisiko aller Kaukasier, ein malignes Melanom zu entwickeln, ist weltweit von 1:1500 (im Jahr 1935) auf 1:75 (im Jahr 2000) gestiegen (Sterry, 2000). Damit hat in den vergangenen Jahrzehnten die Inzidenz des Melanoms in den entwickelten Ländern schneller zugenommen als jede andere maligne Erkrankung (Balch, 1992; Linos *et al.*, 2009). Die Melanominzidenz nimmt in weißen Bevölkerungen weltweit zu, insbesondere bei stark sonnenexponierten hellhäutigen Bevölkerungsgruppen. Die höchsten Inzidenzraten weltweit

## 1. Einleitung

---

wurden in Australien und Neuseeland beschrieben (30-60 Fälle/100.000 Einwohner und Jahr; Marks, 2002). In Bevölkerungen mit stärkerer Pigmentierung (Asiaten und Afrikaner) ist das Melanom selten und nahezu ausschließlich im Schleimhautbereich oder palmoplantar lokalisiert. Individuen mit hoher Nävus-Zahl und Träger von Melanomvorläufern (sog. dysplastische Nävi, kongenitale Nävi) sind zusätzlich besonders gefährdet (Garbe *et al.*, 2008). Für die Entstehung des Melanoms ist in erster Linie die UV-Exposition verantwortlich. Eine besondere Rolle spielt dabei die UV-Strahlenbelastung in der Kindheit und Jugend. Jeder einzelne Sonnenbrand im Baby- und frühen Kindesalter scheint das Risiko zu erhöhen (Whiteman *et al.*, 2001). Beim malignen Melanom wurde die ätiologische Bedeutung der UV-Strahlung zunächst in Frage gestellt (Epstein, 1978). Inzwischen gibt es eine solide Evidenz dafür, dass UV-Strahlung ein wichtiger ätiologischer Faktor für die Melanomentstehung ist (Thompson *et al.*, 2005; Tucker u. Goldstein, 2003). Eine zusätzliche sozioökonomische und psychologische Bedeutung kommt der Tatsache zu, dass die Melanominzidenz nicht so stark altersabhängig wie die Mehrheit maligner Erkrankungen ist, sondern eine der häufigsten Krebsarten und Krebstodesursachen in der Altersgruppe der 20-35 Jährigen (Houghton u. Polsky, 2002). Ein weiterer wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung eines malignen Melanoms sind neben physikalischen Merkmalen wie helle Haare, Augen und Haut die erbliche Prädisposition (Czajkowski *et al.*, 2004) sowie die Anzahl von atypischen Nävi (Titus-Ernstoff *et al.*, 2005). Die höchste Zunahme der Inzidenz wurde in Körperregionen beobachtet, die in den letzten Jahrzehnten durch Änderung der Freizeitgewohnheiten vermehrt der Sonne exponiert wurden (S3-Leitlinie Melanom, 2013). Bei Frauen entwickeln sich Melanome häufiger an den unteren Extremitäten (Beine und Füße), während bei Männern Melanome häufiger am Rumpf, insbesondere am Rücken auftreten (Garbe, 2006). Generell sind die Areale des Körpers, die häufig der Sonne ausgesetzt sind, stärker betroffen, es gibt jedoch auch Melanome an Stellen, die nie oder praktisch nie dem Sonnenlicht ausgesetzt sind (z. B. Speiseröhre, Fußsohle, Zwischenzehenbereich, Garbe *et al.*, 1993 u. 1995).

Die Melanominzidenz ist in den vergangenen 30 Jahren kontinuierlich gestiegen (American Melanoma Foundation, 2014), aber die Sterblichkeit ist gleich geblieben (Stang *et al.*, 2001). Die Ursache dafür liegt in einer Verbesserung der Früherkennung des Melanoms mit einer beständigen Abnahme der Tumordicke bei primärer Diagnose des Melanoms, und damit

verbesserte sich auch die Prognose des Melanoms. Regelmäßige Vorsorgeuntersuchungen führen dazu, dass Melanome früher erkannt werden (Breitbart *et al.*, 2012).

### 1.1.3 Histopathologie und Entwicklung des kutanen Melanoms

Die Früherkennung des Melanoms spielt für die weitere Prognose eine wesentliche Rolle. Das Melanom eignet sich in besonderer Weise für die Früherkennung, da es sich in den meisten Fällen bereits klinisch eindeutig erkennen lässt. Für die frühe klinische Diagnose wurden Merkmale wie die ABCDE-Regel herausgestellt, bei der Pigmentmale mit den Merkmalen Asymmetrie (A), unregelmäßige Begrenzung (B), variierende Coloration (C), Durchmesser >5 mm (D) und Erhabenheit/Entwicklung und rasche Evolution (Veränderung) in den letzten 3 Monaten (E) als malignitätsverdächtig definiert wurden (S3-Leitlinie Melanom, 2013). Bereits Ende der 1960-er Jahre wurden von Clark und Mitarbeitern Kriterien für die Unterscheidung verschiedener klinisch-histologischer Subtypen des Melanoms entwickelt von denen sich in der Folgezeit folgende vier Histologie-Subtypen herausstellten (Clark *et al.*, 1969a; Elder *et al.*, 1980; McGovern *et al.*, 1973 u. 1986):

- 1) Die häufigste Variante des Melanoms ist das **superfiziell spreitende Melanom (SSM)**. Es ist mit einem relativen Anteil von ca. 50 – 70 % aller Melanome das am Häufigsten vorkommende Melanom. Es entwickelt sich innerhalb eines bis vier Jahren bevorzugt an Rücken, Brust und Extremitäten. Seine Entwicklung ist vorwiegend horizontal mit farblicher Vielfalt wie braun, grau, rosa bis blauschwarz. Selten erscheinen einige Areale auch weißlich. Es ist flach, teils knotig und von der gesunden Haut oft scharf abgegrenzt.
- 2) Ca. 18 – 25 % der Melanome gehören zu den sogenannten **nodulären Melanomen (NM)**. Wie das SSM entsteht es häufig am Rücken, Brust und Extremitäten. Das NM ist primär vertikal wachsend und entwickelt sich während einigen Monaten und zeigt sich als erhabener, knotiger und häufig blutender Tumor. Farblich variiert es von blau bis dunkelbraun. Durch das stark ausgeprägte Tiefenwachstum besitzt das NM die schlechteste Prognose aller Melanome.
- 3) Das **Lentigo-maligna Melanom (LMM)** macht ca. 8 – 12 % aller Melanome aus. Es ist das Melanom des alten Menschen und entwickelt sich langsam während Jahren bis Jahrzehnten auf dem Boden der Krebsvorstufe Lentigo maligna (in-situ Melanom). Zu den bevorzugten Lokalisationen gehören Gesicht, Hals, Arme und Hände. Das LMM fällt als

## 1. Einleitung

---

mehrere Zentimeter großer und flacher Herd auf. Die Prognose dieses Tumortyps ist, verglichen mit anderen Melanomtypen, relativ gut (Clark *et al.*, 1969b).

- 4) Der 4. Subtyp sind die **akrolentiginösen Melanome (ALM)** mit ca. 4 – 5 %. Sie entwickeln sich im Bereich der Akren (Handflächen, Fußsohlen und unter den Nägeln). Das ALM zeichnet sich durch unscharfe, vielfarbige Flecken aus und ähnelt somit dem LMM, ist jedoch aggressiver, vor allem weil das ALM dicker ist als ein SSM oder LMM. Nicht selten wird das ALM für eine banale Nagelverletzung, Nagelpilz oder sogar für eine Warze gehalten, was die richtige Diagnose und damit auch die Therapie verzögern kann.
- 5) Einige Histologie-Subtypen sind nicht klassifizierbar oder stellen seltenere **Sonderformen** dar, z.B. nävoide, spitzoide, amelanotische Melanome oder Melanome in einem Riesennävus. Ungefähr 5 % der malignen Melanome werden als Sonderform klassifiziert.

Da Melanozyten auch im Körperinnern vorhanden sind, gibt es neben dem hier behandelten Melanom der Haut (kutanen Melanom) auch Melanome der Schleimhäute, des Auges (Bindehautmelanom, Aderhautmelanom), des Zentralnervensystems und der inneren Organe. Diese Tumorlokalisationen sind aber mit ca. 1 % aller Melanomfälle recht selten. Diese unterschiedlichen Subtypen zeigen in vielen Studien markante Unterschiede in ihrer anatomischen Verteilung, Erkrankungsalter, Verhältnis zur UV-Strahlung und dem Muster der somatischen Mutationen auf und werden daher in letzter Zeit gerne als mehrere einzelne Erkrankungen in Betracht gezogen (Curtin *et al.*, 2005; Viros *et al.*, 2008; Whiteman *et al.*, 2011).

## Entwicklung

Clark und Elder lieferten ein Modell für die Tumorentwicklung des malignen Melanoms. Hier wird die Entstehung eines metastasierenden Melanoms als ein Prozess beschrieben, der über zwei Wachstumsphasen verläuft (Clark 1991a+b; Valyi-Nagy *et al.*, 1991; Elder, 1993). In der ersten radiären Wachstumsphase (RGP, Radial Growth Phase) findet eine horizontale Ausbreitung der Tumorzellen in der Basalschicht der Epidermis statt. RGP-Melanome besitzen noch keine Möglichkeit zur Metastasierung, da sie nicht in die Dermis eingewandert sind (Herlyn *et al.*, 1987). Erst in der zweiten vertikalen Wachstumsphase (VGP, Vertical Growth Phase) durchdringen die Melanomzellen die Basalmembran, infiltrieren die Dermis und besitzen die Fähigkeit zu invasivem, metastatischem Wachstum. Zuletzt steht das metastasierende Melanom, welches sich sowohl über das Blut- als auch über das

## 1. Einleitung

---

Lymphgefäßsystem im gesamten Körper ausbreiten kann. Dieses Modell kann zeitlich unterschiedlich schnell verlaufen. So besteht die Möglichkeit, dass ein Melanom auch ohne seine direkte Vorläuferläsion beispielsweise direkt aus Melanozyten oder einem Nävus („direkte Melanomentstehung“) entstehen kann (Clark, Jr. *et al.*, 1984; Lopansri u. Mihm, Jr., 1979). Umgekehrt ist auch ein Stillstand der Progression möglich, so dass nicht jedes Melanom notwendigerweise die komplette Entwicklung bis hin zur Metastasierung durchlaufen muss.

### **Metastasen des malignen Melanoms**

Kennzeichnend für das maligne Melanom ist seine Tendenz zur frühzeitigen Metastasierung. Das Melanom kann sowohl primär lymphogen als auch primär hämatogen metastasieren. Etwa 2/3 aller Erstmetastasierungen sind zunächst auf das regionäre Lymphabflussgebiet beschränkt. Das maligne Melanom kann generell geheilt werden (85 %), wenn die primäre Läsion chirurgisch vor der Diagnose von Metastasen entfernt wird (Houghton u. Polsky, 2002). Diese hohe Heilungsrate betrifft fast ausschließlich Tumore, deren Ausbreitung streng lokal begrenzt sind. Die Metastasierung verläuft in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten. Verschiedene Risikofaktoren, wie die Tumordicke und das Invasionslevel, die je nach Geschlecht prozentual unterschiedlich verteilte Tumorlokalisation, bestimmen den Prozess der Metastasierung entscheidend mit. Dabei ist bemerkenswert, dass ein Melanom mit einer vertikalen Dicke von 2,01 mm bereits als relativ groß gilt. Die Lokalisation des Primärtumors (ungünstige Prognose insbesondere für Hals, Oberarme und oberen Stamm) scheint zudem ein wichtiger Faktor zu sein (Meier *et al.*, 2002). Die Melanommetastasen werden klinisch unterteilt in:

- Satellitenmetastasen (2-5 cm um den Primärtumor)
- In-Transit-Metastasen (5 cm vom Primärtumor entfernt, zwischen Primärtumor und regionalem Lymphknoten)
- Regionäre Lymphknotenmetastasen
- Fernmetastasen (bevorzugt in Lunge, Leber, Gehirn und an entfernten Hautpartien sowie fernen Lymphknotengruppen)

### 1.1.4 Diagnostik, Therapie und Nachsorge

#### Diagnostik

Ca. 90 % aller malignen Melanome kommen derzeit als Primärtumor ohne erkennbare Metastasierung zur ersten Diagnose. Im Allgemeinen erfolgt die Diagnosestellung am H/E-Präparat. Entscheidend sind die Unterscheidungen zwischen „in situ“ und „invasiv“, die Beurteilung der vertikalen Eindringtiefe in die Dermis (Tumordicke nach Breslow), die Beurteilung des Invasionslevels nach Clark und das Erkennen einer Ulzeration. Die Ausbreitungsdiagnostik orientiert sich an der TNM-Klassifikation (Balch *et al.*, 2001a). Dabei werden die Tumordicke (T), der Befall von Lymphknoten (N) und Fernmetastasen (M) erfasst. Als wichtigstes histologisch-prognostisches Hauptkriterium hat sich die Bestimmung der Tumordicke nach Breslow herausgestellt (Breslow, 1970 u. 1977), mit der das absolute Tiefenwachstum in Millimetern bestimmt wird. Diese Einteilung nach der Tumordicke wurden in der AJCC-Klassifikation von 2001 definiert (Cut-off-Punkte  $\leq 1,0$  mm (T1), 1,01-2 mm (T2), 2,01-4,0 mm (T3) und  $>4$  mm (T4)). Im Unterschied zu vorhergehenden Klassifikationen wird bei der aktuellen Klassifikation von 2009 neben der Tumordicke und Ulzeration auch die Mitosenrate bei Primärmelanom von  $\leq 1,0$  mm einbezogen (Balch *et al.*, 2009). Hinzu wird mit dem Invasionslevel nach Clark die Eindringtiefe des Tumors bezeichnet, die Anhand der anatomischen Strukturen der Haut beschrieben ist (Clark *et al.*, 1969a; **Tabelle 33** im Anhang). In der AJCC/UICC Klassifikation des Melanoms wird zudem die Ulzeration des Tumors als weiteres wichtiges prognostisches Kriterium eingeführt (Balch *et al.*, 2001a+b). Das Vorhandensein einer Ulzeration ist histopathologisch zu diagnostizieren. Sie wird definiert als „Fehlen einer intakten Epidermis über dem Hauptanteil des primären Melanoms in den histologischen Schnitten“ und wird normalerweise durch eine Entzündungsreaktion begleitet und einer Kruste bedeckt (Spatz *et al.*, 2003). Die Regression ist ein Phänomen mit Beteiligung zytotoxischer Lymphozyten, welches den superfiziellen vaskulären Plexus, ein verdicktes Stratum papillare und die Epidermis betrifft (Cooper *et al.*, 1985; Kang *et al.*, 1993; Kelly *et al.*, 1985). Morphologisch erkennt man eine Kombination von Fibrose und Melanose.

#### Therapie

Die wichtigste Therapieform ist die operative Entfernung des Primärtumors. Hierbei wird der Tumor vollständig entfernt, um eine Streuung in die Blut und Lymphbahn zu vermeiden. Bei

## 1. Einleitung

---

der Entfernung wird ein Sicherheitsabstand von je nach Tumordicke 1 oder 2 cm eingehalten, außerdem werden alle Hautschichten unter dem Tumor bis auf die Muskelfaszie entfernt (Balch *et al.*, 2009). Ist der Tumor mehr als einen Millimeter dick, sollte zusätzlich der im Lymphabfluss der betroffenen Hautregion erstgelegene Lymphknoten, der sogenannten Wächterlymphknoten oder "Sentinel Lymph Node" (SLN), operativ entfernt und untersucht werden (Morton *et al.*, 2006). Diese Untersuchung ermöglicht eine bessere Vorhersage des Krankheitsverlaufes. Sind bereits die Lymphknoten von Tumorzellen befallen (pN1-Stadium), sollten die nahegelegenen Lymphknoten vollständig entfernt werden.

Von unseren Kooperationspartnern wurde bereits gezeigt, dass die Disseminierung in die regionalen Lymphknoten bereits sehr früh eintritt, häufig durch die konventionelle pathologische Begutachtung des Wächterlymphknotens übersehen wird, und dass somit bei vielen Patienten gestreute Tumorzellen nach chirurgischer Entfernung des Tumors zurückbleiben deren Lymphknoten histopathologisch als frei von Tumorzellen eingestuft wurden (pN0-Stadium), tatsächlich gestreute Tumorzellen in den Wächter-Lymphknoten nachweisbar sind (Ulmer *et al.*, 2005). Die von diesen Patienten isolierten Tumorzellen können somit als früh-disseminierte Tumorzellen (pN0 DTC) bezeichnet werden und sind somit ein besonders geeignetes Untersuchungsmaterial, um Veränderungen der frühen systemischen Melanomerkrankungen zu identifizieren.

In späteren Stadien, wenn der Tumor bereits Metastasen in Haut, Lymphknoten und inneren Organen gebildet hat, ist die Chance auf eine Heilung gering. Patienten mit fortgeschrittenem Melanom haben eine schlechte Prognose, mit einer 1-Jahres-Überlebensrate von nur 33 % und einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 3 %-10 %, sowie einem medianen Gesamtüberleben (overall survival) von ca. 9 Monaten (Balch *et al.*, 2009; Sterry, 2000; Balch, 2001; ZMM, 2002).

Gegenwärtige Therapien beinhalten Chemotherapie, Strahlentherapie und Immuntherapie (Brose *et al.*, 2002; Bhatia *et al.*, 2009; Korn *et al.*, 2008), die in der Regel nur eine zeitweilige Besserung bieten, jedoch meist keine Aussicht auf Heilung haben. Die Behandlung vom bereits metastasierten Melanom ist zudem eine Herausforderung, da nur eine kleine Minderheit von Patienten auf die vorhandene Standard-Chemotherapie positiv ansprechen. Für die Chemotherapie stehen verschiedene Substanzen zur Verfügung (z.B. Dacarbazin, Temozolomid, Fotemustin).

## 1. Einleitung

---

In der neuen S3 Leitlinie von 2013 wird der Nachweis einer B-RAF Mutation ab Stadium IIIB zur molekulargenetischen Diagnostik des malignen Melanoms empfohlen, da therapeutische spezifische Inhibitoren bereits zur Verfügung stehen.

Die aktuellen Therapieansätze beim Melanom beruhen auf der Blockade molekularer Prozesse in der Signaltransduktion der Zelle. Als Vorbild, dient die Entdeckung der Hemmung der Fusionskinase BCR-ABL um die chronische myeloische Leukämie zu behandeln (Druker *et al.*, 2001). Es gibt erfolgversprechende Studien über eine Kombination eines klassischen Chemotherapeutikums mit B-RAF-Kinase-Inhibitoren wie beispielsweise Sorafenib oder Vemurafenib. Die Entstehung von bestimmten, klinisch wirksamen Inhibitoren gegen die V600-B-RAF Mutation, war ein wichtiger Meilenstein auf dem Gebiet der personalisierten Medizin (Eggermont *et al.*, 2009; Griewank *et al.*, 2014). Die klinische Wirksamkeit der ersten Verbindung (Vemurafenib) wurde im Jahr 2010 berichtet (Bollag *et al.*, 2010; Flaherty *et al.*, 2010), gerade einmal 8 Jahre nach der Identifizierung der B-RAF-Mutationen im Melanomen (Davies *et al.*, 2002). In einer Reihe von klinischen Studien zeigte Vemurafenib bei Patienten mit einem B-RAF-mutierten metastasierenden Melanom eine frühe Reaktion. In Phase-III-Studien zeigte Vemurafenib Ansprechraten von 48 % und mit einem PFS („median progression-free survival“ - progressionsfreies Überleben) von 5,3 Monaten. Dacarbazin zeigte dagegen ein PFS von 1,6 Monaten und eine Ansprechraten von nur 5 % (Chapman *et al.*, 2011). Ein weiterer B-RAF V600 Inhibitor ist das Dabrafenib. Es hemmt das mutierte B-RAF Protein in den Melanomen mit B-RAF<sup>V600E</sup> und B-RAF<sup>V600K</sup> Genotypen (Menzies *et al.*, 2012). Dabrafenib ist ein selektiver B-RAF Inhibitor gekennzeichnet mit hohen Ansprechraten, schneller Wirkungsweise, geringe Toxizität und ein längeres progressionsfreies Überleben (PFS 5,1 Monate) im Vergleich zur Chemotherapie (Hauschild *et al.*, 2009 u. 2012). Die Nebenwirkungen von beiden B-RAF Inhibitoren sind ähnlich, wie zum Beispiel Lichtempfindlichkeit, warzenförmige Keratosen (bis zu 49 %) und kutane Plattenepithelkarzinome (ca. 25 %; Anforth *et al.*, 2012; Sosman *et al.*, 2012). Vor der Entwicklung von selektiven B-RAF Inhibitoren und neueren Immuntherapien (Flaherty *et al.*, 2010; Neagu *et al.*, 2010) war das metastasierende Melanom weitgehend resistent gegen eine systemische Behandlung. Des Weiteren gibt es noch den MEK-Inhibitor Trametinib (Kim *et al.*, 2013), der ein PFS von 4,8 Monaten aufweist. In Kombination mit Dabrafenib kommt es zu einem PFS von 9,4 Monaten. Ein weiterer neuer MEK-Inhibitor ist der Wirkstoff MEK162, der auf B-RAF mutierte sowie auch auf N-RAS mutierte Melanome wirkt (Phase I+II; N-RAS PFS



## 1. Einleitung

---

von 3,6 Monaten; Ascierto *et al.*, 2013). Eine Heilung ist durch diese Therapien in der Regel nicht möglich. Allerdings kann eine Rückbildung der Metastasen erreicht werden, so dass sich die tumorbedingten Beschwerden lindern lassen.

Aufgrund der NGS („next generation of sequencing“) werden immer mehr neue mutierte Gene im Melanom entdeckt, worauf ein Wirkstoff entwickelt werden kann (Eggermont u. Robert, 2011). Eine Anzahl von neuen Onkogenen-Kandidaten, wie das MAPK1/2, ERBB4, GRIN2A, GRM3, RAC1 und PREX2 wurden so identifiziert (Kunz, 2014). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass in den nächsten Jahren die Auswahl von mehreren therapeutischen Wirkstoffen (basierend auf die Mutation eines Patienten) für eine personalisierte Therapie zur Verfügung stehen werden (Greenman *et al.*, 2007; Thomas RK *et al.*, 2007; Dutton- Regester u. Hayward, 2012; Jeck *et al.*, 2014).

Desweiteren werden chirurgische Eingriffe zur Verringerung der Tumormasse oder eine Strahlentherapie eingesetzt.

### **Nachsorge**

Der Umfang und die Frequenz der Nachsorgeuntersuchungen orientieren sich ähnlich wie das therapeutische Vorgehen an den initialen Tumorparametern bzw. Tumorstadium. Die Nachsorge ist in den ersten 5 postoperativen Jahren intensiv, da hier 90% der Metastasen auftreten. Spätmetastasen sind jedoch nicht ungewöhnlich, so dass generell eine Nachsorge über 10 Jahre empfohlen wird.

## **1.2 Genomische und molekulare Veränderungen im malignem Melanom**

Die Krebsentstehung geht bei vielen Tumoren mit einem Verlust der Kontrolle über die genomische Stabilität einher (Disseminierung von Tumorzellen) und resultiert in einem, auch durch Selektion, veränderten Genom der Tumorzellen. Die komparative genomische Hybridisierung (CGH) ist eine Methode, mit der das Genom von Tumorzellen auf klonale chromosomale Aberrationen hin untersucht werden kann. Hier können Aberrationen in den Proben durch die Intensitätsunterschiede der eingesetzten Fluorochrome (Tumor DNA und Referenz DNA) berechnet werden und die Amplifikationen und Deletionen sichtbar gemacht werden (Kallioniemi A *et al.*, 1992; du Manoir *et al.*, 1993). Die Auflösung der CGH beträgt 10-40 Mb. Um genomische Aberrationen signifikant festzustellen, müssen diese in der Regel in über 60% der Zellen vorliegen. Es gibt mittlerweile auch mehrere hochauflösende Verfahren,

## 1. Einleitung

z.B. wie die Array-CGH (je nach Chip in einer Größenordnung von 1kb bis 1Mio bp). Diese war jedoch zum Zeitpunkt der Arbeit noch nicht für Einzelzellen einsetzbar. Mit der CGH-Methode wurde bereits gezeigt, dass sich Melanome von melanozytären Nävi durch häufige chromosomale Aberrationen unterscheiden lassen (Bauer u. Bastian 2006). Die benignen melanozytären Tumore zeigten typischerweise keine chromosomalen Veränderungen, während man bei der überwiegenden Anzahl der Melanome Zugewinne und Verluste von bestimmten Chromosomen findet.

Es ist bekannt, dass Krebs nicht von einer Mutation in einem einzelnen Gen entstehen kann, sondern er ist auf genetische Veränderungen in verschiedenen Signalwegen angewiesen (Hanahan u. Weinberg, 2000). Bei der Analyse von genetischen Veränderungen im Melanom, wurden einige Mutationen identifiziert, die zur Aktivierung von Signalwegen führen und so das Wachstum und das Überleben von Tumorzellen fördern (Daud u. Bastian, 2012). Die bislang bekannten Signalwege, die im Rahmen der malignen Transformation von Melanozyten eine Rolle spielen, sind in **Tabelle 1** zusammengefasst.

**Tabelle 1:**      *Übersicht über die verzeichneten Mutationen in sporadischen Melanom Fällen*

Signalweg	Gen	Mechanismus
<b>p16/RB</b>	p16	Verlust/Mutation
	CDK4	Mutation
	Cyclin D1	Amplifikation
<b>p53</b>	p53	Verlust/Mutation
	APAF-1	Verlust/Niederregulierung
<b>MAPK</b>	B-RAF	Mutation
	N-RAS	Mutation
<b>WNT</b>	β-Catenin	Mutation
<b>PI3K</b>	PTEN	Deletion/Mutation
	PKB/Akt	Überexpression
<b>BCL-XL</b>		Überexpression
<b>MYC</b>		Amplifikation/Überexpression

Tabelle wurde nach Gray-Schopfer *et al.*, 2005 erstellt.

### 1.2.1 MAPK- und PI3K-AKT-Signaltransduktionsweg

Beim malignem Melanom sind sowohl der RAS-RAF-MAPK- als auch der PI3K-AKT-Signaltransduktionsweg über mehrere Mechanismen konstitutiv aktiviert und haben daher Schlüsselfunktionen bei der Melanomentwicklung und -progression (Meier *et al.*, 2005). Der Wachstumsvorteil durch konstitutive Aktivierung dieser Wege führt zu einer positiven

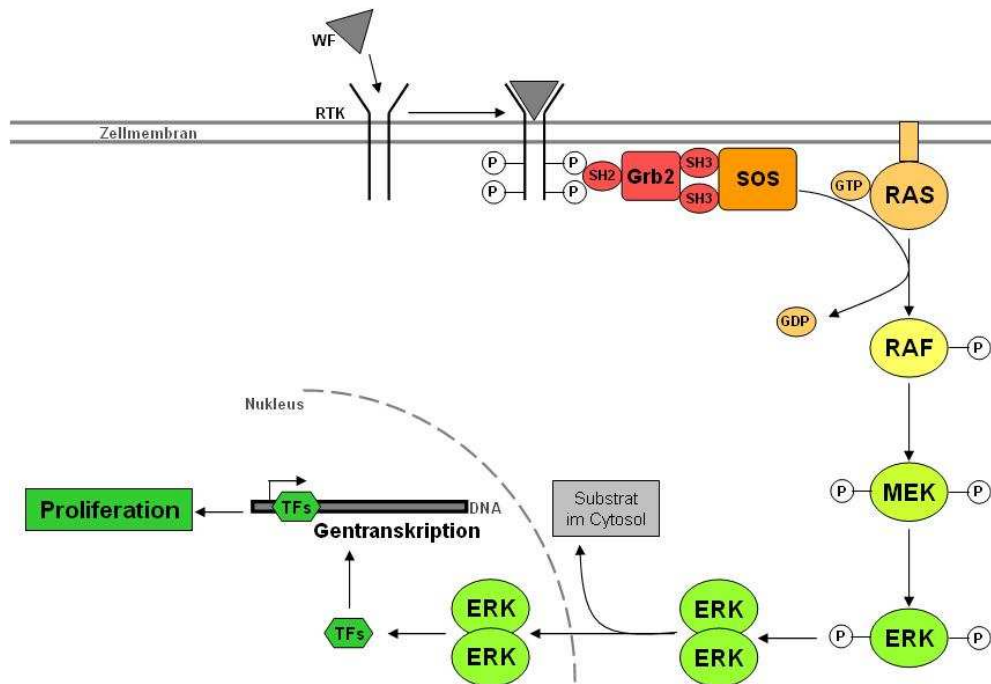
## 1. Einleitung

---

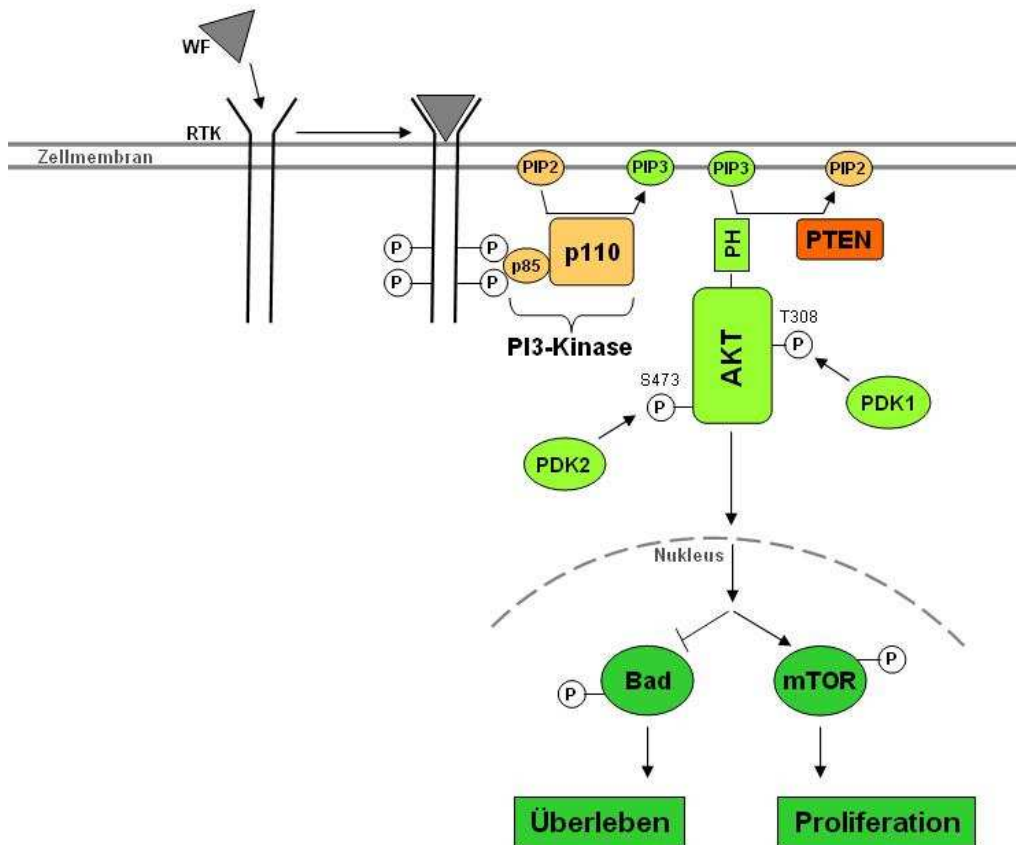
Selektion von Zellen, welche die Mutationen erlangt haben. In vielen Fällen führt das zu einer kritischen Abhängigkeit von den Krebszellen auf ihre Aktivierung (Daud u. Bastian, 2012). Dies schafft Möglichkeiten für therapeutische Interventionen, die gezielt auf die Signalwegskomponenten wirken. Als Vorbild, dient die Entdeckung der Hemmung der Fusionskinase BCR-ABL um die chronische myeloische Leukämie zu behandeln (Druker *et al.*, 2001).

Der RAS-RAF-MAPK-Signaltransduktionsweg setzt sich aus einer Kaskade signalübertragender Proteine zusammen und ist in **Abbildung 1** erläutert. Der MAPK-Weg ist ein wichtiger intrazellulärer Signaltransduktionsweg, der zuständig ist für die Zellproliferation, Genexpression, Differenzierung, Mitose, das Überleben der Zelle und die Apoptose reguliert (Wong, 2009; Wan *et al.*, 2004; Peyssonnaud u. Eychene, 2001). Wenn nun Mutationen in den Genen aus diesem Signalweg auftreten, kann es zur Aktivierung bestimmter Proteine führen. Diese Proteine können dann zum Beispiel zu einer erhöhten Zellproliferation und einer Apoptose-Resistenz führen. Beides führt zu Krebs (Wong, 2009; McCubrey *et al.*, 2006).

Ein weiterer wichtiger Signalweg ist der Phosphatidylinositol 3' Kinase Signalweg (**Abbildung 2**). Der Verlust der PTEN-Funktion (phosphatase and tensin homolog; ein negativer Regulator dieses Weges), vor allem durch Deletion, ist die häufigste bekannte genetische Veränderung in der PI3-Kinase-Kaskade (Curtin *et al.*, 2005; Tsao *et al.*, 2000 u. 2004).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des RAS-RAF-MEK-ERK (MAPK)-Signaltransduktionsweges**  
 Ein extrazellulärer Faktor, wie z.B. ein Wachstumsfaktor (WF) interagiert mit seiner Rezeptortyrosinkinase (RTK) und führt zur Dimerisierung des Rezeptors und Autophosphorylierung der Tyrosinreste. Die phosphorylierten Tyrosinreste fungieren als Andockungsstellen für das Adapterprotein Grb2, das bewirkt, dass der GDP/GTP-Austauschfaktor SOS zur Zellmembran transloziert. SOS induziert die Umschaltung der GTPase RAS vom inaktiven GDP-gebundenen Status zum aktiven GTP-gebundenen Status. Aktiviertes RAS bindet an die Serin/Threonin-Kinasen A-RAF, B-RAF und C-RAF/RAF-1 und rekrutiert sie zur Zellmembran. Aktiviertes RAF phosphoryliert und aktiviert MEK, das wiederum ERK phosphoryliert und aktiviert. Die Bedeutung des ERK Signalweges beim Melanom ist hinreichend dokumentiert (Bennett, 2003; Cohen et al., 2002; Smalley, 2003). Aktiviertes ERK (Endpunkt des RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweges) hat zahlreiche Substrate im Cytosol (Meier et al., 2005; Hilger et al., 2002; Mc Cubrey et al., 2006). Phosphoryliertes ERK kann in den Nukleus translozieren und reguliert dort die Genexpression über Phosphorylierung und Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren (TF) (Friday u. Adjei, 2008) Die Aktivierung dieser TF führen zu Genexpressionen von Genen, die die Zellproliferation und das Überleben regulieren (Friday u. Adjei, 2008). Modifiziert nach Garbe (2006).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des PI3K-AKT-Signaltransduktionsweges**

Ein extrazellulärer Faktor, wie z.B. ein Wachstumsfaktor (WF) interagiert mit seiner Rezeptortyrosinkinase (RTK). Die Interaktion führt zur Autophosphorylierung der Tyrosinreste. PI3K (Phosphatidylinositol-3 Kinase), bestehend aus der Adapteruntereinheit p85 und der katalytischen Untereinheit p110, transloziert zur Zellmembran und bindet über seine Adapteruntereinheit an die Phosphotyrosine der RTK. Dies führt zur allosterischen Aktivierung der katalytischen Untereinheit, die zur Produktion von PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat) führt. PIP3 rekrutiert Signalproteine mit Plexstrin Homologe (PH) Domänen zur Zellmembran, inklusiv AKT. PTEN ist eine PIP3-Phosphatase und ist der negativ Regulator des PI3K-AKT-Signalweges. Die Interaktion von PIP3 mit der PH Domäne von AKT induziert wahrscheinlich Konformationsänderung von AKT, wodurch die beiden essentiellen Phosphorylierungsstellen T308 und S473 exponiert werden. Die Phosphorylierung von T308 und S473 durch Protein Serin/Threonin Kinase 3'-phosphoinositide-abhängige Kinasen 1 und 2 (PDK1 und PDK2) wird benötigt für eine maximale AKT Aktivierung. Aktiviertes AKT transloziert in den Nukleus und vermittelt die Aktivierung und Inhibition verschiedener Substrate, die Zellüberleben, -wachstum und -proliferation regulieren. Modifiziert nach Garbe (2006).

### 1.2.1.1 Die Onkogene N-RAS und B-RAF

Das erste identifizierte Onkogen für das maligne Melanom war das RAS Gen (Albino *et al.*, 1984). Aktivierende Mutationen des RAS Gens wurden in 9-15 % der Melanome gefunden, wobei die meisten das N-RAS<sup>1</sup> Gen (Chromosom 1p13.2) betreffen (Carr u. MacKie, 1994; van Elsas *et al.*, 1995), während H-RAS oder K-RAS selten mutiert sind (Curtin *et al.*, 2005). Diese Verteilung unterscheidet sich von der allgemeinen RAS Mutationsrate in anderen Krebsarten, bei denen das *K-RAS* mit Abstand (85 %) das am häufigsten mutierte Gen von RAS ist (Downward 2003). Bei Omholt und Mitarbeitern (2002) treten bis zu 30 % der kutanen Melanomfälle mit einer N-RAS Mutation auf. Mutationen des N-RAS Gens stabilisieren das N-RAS Protein, wenn es an GTP gebunden ist, und führen somit zur konstitutiven Aktivierung von N-RAS. Aktiviertes N-RAS Protein phosphoryliert dann B-RAF, C-RAF und die PI3K-Kinase. Die häufigste Mutation von N-RAS liegt im Codon 61 (wie z.B. p.Q61K und p.Q61R, 15-20%). Weitere Mutationsformen liegen im Codon 12/13, diese sind jedoch seltener (z.B. p.G12D und p.G13D).

Die RAF-Familie besteht beim Menschen aus drei Serin/Threonin-Kinasen: A-RAF, B-RAF und C-RAF (RAF-1) (Marais *et al.*, 1997; Hagemann u. Rapp, 1999). Alle drei RAF-Isoformen haben aber RAS als Aktivator und MEK als Effektor gemeinsam, wobei B-RAF<sup>2</sup> der Hauptaktivator von MEK ist (Wan *et al.*, 2004). Die Aktivierung von B-RAF wird allein durch die Bindung an RAS erreicht, während die Aktivierung von A-RAF und C-RAF noch zusätzliche Signale erfordert (z.B. Src). Nur B-RAF ist häufig bei Krebs mutiert, darunter auch das maligne Melanom. Die *B-RAF* Mutation wurde ursprünglich in Melanoma-Zelllinien entdeckt (Davies *et al.*, 2002). Das onkogene B-RAF resultiert aus Mutationen im B-RAF Gen (Davies *et al.*, 2002; Wellbrock *et al.*, 2004). Aktivierende Mutationen (somatische Punktmutationen) in B-RAF lassen das Protein überaktiv werden. Dabei dominiert (über 90 %) die Substitution von Valin zu Glutamat an der Position 600 durch den Basenaustausch von T zu A im Exon 15 des Chromosoms 7q34 (p.V600E oder c.1799T>A; Davies *et al.*, 2002). Andere seltene Varianten dieser Punktmutation sind Lysine (K; p.V600K), Aspartat (D; p.V600D) und Arginin (R; p.V600R). Das B-RAF reguliert durch eine erhöhte Kinase-Aktivität (Davies *et al.*, 2002) über den RAS-RAF-MAPK-Signaltransduktionsweg die Proliferation, Differenzierung und das Überleben bzw. die

---

<sup>1</sup> Neuroblastoma RAS Virale (v-ras) Onkogene Homolog; OMIM 164790

<sup>2</sup> V-RAF Murine Sarcoma Virale Oncogene Homolog B1; kurz B-RAF oder RAFB1, OMIM 164757

## 1. Einleitung

---

Apoptose (Wong, 2009; Wan *et al.*, 2004; Peyssonnaud u. Eychene, 2001; Mc Cubrey *et al.*, 2006).

Mehrere Studien belegten, dass mutiertes B-RAF<sup>V600E</sup> beim Melanom konstitutiv ERK aktiviert und somit die Zellproliferation fördert (Brose *et al.*, 2002; Karasardides *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2003; Sumimoto *et al.*, 2004; Hingorani *et al.*, 2003; Huntigton *et al.*, 2004; Pollock *et al.*, 2003). In Davies Studie (2002) konnte in 67 % der Melanome (6 von 9 untersuchten Primärtumorproben) und in Melanom-Zelllinien die B-RAF<sup>V600E</sup> Mutation detektiert werden, wohingegen spätere Untersuchungen meist niedrigere Inzidenzraten zwischen 20 und 80 % fanden (Cruz 3rd *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2003; Lang u. MacKie 2005; Omholt *et al.*, 2003; Reifemberger *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2004; Shinozaki *et al.*, 2004; Uribe *et al.*, 2003; Yazdi *et al.*, 2003). Weitere Forschungsergebnisse zeigen zudem, dass die B-RAF Isoform auch bei anderen Krebsarten häufig mutiert vorliegt:

- ~40 % beim papillären Schilddrüsentumoren (Mc Cubrey *et al.*, 2006; Prichard *et al.*, 2007)
- ~30 % beim serösen Ovarialtumoren (Prichard *et al.*, 2007)
- ~10 % bei Kolorektal Tumoren (Cho *et al.*, 2006)
- ~10 % bei Prostata Tumoren (Cho *et al.*, 2006)

In Melanom-Zelllinien finden sich Mutationen oder Deletionen von PTEN zusammen mit B-RAF Mutationen, nicht jedoch mit N-RAS (Tsao *et al.*, 2000 u. 2004; Curtin *et al.*, 2005). Offenkundig kann N-RAS sowohl den PI3K- als auch den MAPK-Signalweg aktivieren, während B-RAF nur den MAPK Signalweg aktiviert (Curtin *et al.*, 2005; Dahl u. Guldberg, 2007). Diese positive Korrelation zwischen dem PTEN-Verlust und der B-RAF Mutationen lässt vermuten, dass der PI3K Signalweg ein Ziel unabhängiger Mutationsereignisse bei der malignen Transformation von Melanozyten ist. Noch dazu ist in der Literatur beschrieben, dass eine Mutation entweder in N-RAS oder in B-RAF vorkommen kann, nicht beides zusammen. Sie schließen sich gegenseitig aus (Curtin *et al.*, 2005; Gorden *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2003).

### 1.2.1.2 ERK Signalweg

Die Verbindung des ERK Signalweges zum Zellzyklus wird illustriert durch die starke Expression des Cyclin D1 (CCND1) in Melanomen, eines der Zielgene des ERK Signalweges. ERK reguliert die Expression von Cyclin D1 (Welsh *et al.*, 2001). Weiterhin ist eine anhaltende

## 1. Einleitung

---

ERK-Aktivierung erforderlich, um den G1-Restriktionspunkt zu passieren (Pagès *et al.*, 1993). Cyclin D1 liegt auf dem Chromosom 11q13.3. Bei akralen und mukosalen Melanomen finden sich für das Cyclin D1 und seinen Bindungspartner CDK4 häufig Amplifikationen, während hier B-RAF und N-RAS seltener mutiert sind (Curtin *et al.*, 2005). Diese Komplementarität von B-RAF, N-RAS, CCND1 und CDK4 unterstreicht die Bedeutung des RAS-RAF-MAPK-Signaltransduktionsweges im Melanom. Curtin *et al.* (2005) zeigten zudem in ihrer Studie, dass Melanome mit wildtyp B-RAF oder N-RAS häufig eine Erhöhung der Anzahl der Kopien der Gene für die Cyclin-abhängige Kinase 4 (CDK4) und CCND1 aufwiesen (19 %). Dies deutet darauf in, dass CDK4 und CCND1 als neue unabhängige Onkogene beim Melanomen in Betracht kommen könnten. Schließlich sind Moleküle, die den Zellzyklus regulieren, häufig genetisch inaktiviert oder aktiviert. Einen Zellzyklustop bewirken die beiden Tumorsuppressoren p16 und p14, Genprodukte von *CDKN2A*. P16 reguliert den proliferationsfördernden CCND1-CDK4-Komplex und liegt häufig in mutierter Form beim familiären Melanom vor (Kefford *et al.*, 2002). Bei sporadischen Melanomen findet man eine Deletion in dem *CDKN2A* Locus in etwa 50 % der Fälle (Curtin *et al.*, 2005), wobei hier Melanome der Akren und der Schleimhäute häufiger betroffen sind. P14 verstärkt physiologisch die Funktion des Tumorsuppressors p53, während seine Deletion mit einem erhöhten Abbau von p53 einhergeht - mit der Konsequenz einer erhöhten Zellteilungsrate und genetischen Instabilität (Sharpless u. Chin, 2003).



### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Metastasierung des Melanoms in den ersten drainierenden Lymphknoten, den so genannten Wächterlymphknoten, beeinflusst das Überleben von Patienten mit klinisch lokalisierter Melanomerkrankung entscheidend (Balch *et al.*, 2001; Ulmer *et al.*, 2005). Einen Nachweis einer möglichen Metastasierung ermöglicht die histopathologische Untersuchung des Wächterlymphknotens. Der Prozess der Metastasierung, gerade in der frühen Phase, ist beim malignen Melanom noch unzureichend verstanden. Die Frage, auf welche Art frühe genomische Veränderungen maligner Zellen identifiziert werden können, ist somit von großer Wichtigkeit.

Das Ziel dieser Doktorarbeit war die Identifizierung wichtiger Genomveränderungen, die für die Entstehung und die systemische Progression des malignen Melanoms verantwortlich sein könnten. Ebenso war das Auftreten wichtiger genomischer Veränderungen in einen zeitlichen Bezug zur Ausbreitung des malignen Melanoms zu setzen. Dabei lag der Gedanke zugrunde, dass Veränderungen nach Absiedelung der Zellen zwischen Primärtumor (PT) und disseminierten Melanomeinzelzellen (DTC) vom selben Patienten divergieren. Gemeinsame Veränderungen hingegen sollten vor der Absiedelung entstanden sein.

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit sollte die Erstellung einer umfassenden Gewebe- und DNA-Bank für das maligne Melanom sein.

Zur Identifizierung der chromosomalen Veränderungen sollten zunächst die PT und die DTC mit Hilfe der vergleichenden Genomhybridisierung (CGH) analysiert werden. Bioinformatische und statistische Methoden sollten die jeweils charakteristischen Veränderungen der jeweiligen Tumortypen, sowie der geteilten Genomveränderungen ermitteln. Als zusätzliches drittes Analysematerial sollten auch einige Metastasenzellen (Met) hinzugezogen werden.

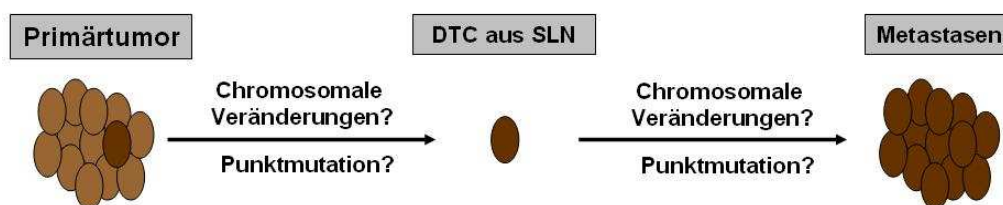
Im Rahmen der Arbeit war auch die gemeinsame Entwicklungslinie durch gemeinsame Punktmutationen in den bekannten Onkogenen B-RAF und N-RAS zu definieren. Es sollte untersucht werden, ob B-RAF und N-RAS klonal in allen disseminierten Tumoreinzelzellen gleichsinnig verändert sind. Können die Tumorzellen auch ohne diese Mutationen disseminieren, obgleich im Primärtumor diese vorliegen? Für die Bestimmung des Mutationsstatus sollte eine B-RAF- und eine N-RAS-spezifische SSCP-PCR (single strand conformation polymorphism, Orita *et al.*, 1989) etabliert werden.

## 1. Einleitung

---

Bekannt ist, dass beim malignem Melanom sowohl der RAS-RAF-MAPK- als auch der PI3K-AKT-Signaltransduktionsweg über mehrere Mechanismen konstitutiv aktiviert sind und haben daher Schlüsselfunktionen bei der Melanomentwicklung und -progression (Meier *et al.*, 2005). Aus diesem Grund sollten bei den disseminierten Tumoreinzelnzellen mittels der CGH-Analysen die Chromosomenregionen genauer betrachtet werden, wo weitere Gene dieser Signaltransduktionswege liegen. Bei einer auffälligen Veränderung (Amplifikation) in den DTC sollte ein weiteres Gen herausgepickt werden und mittels der quantitativen PCR untersucht werden.

Zusammenfassend soll in dieser Dissertation, das Auftreten wichtiger genomischer und molekularer Veränderungen in einen zeitlichen Bezug zur Ausbreitung des malignen Melanoms gesetzt werden (**Abbildung 3**).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Fragestellung

## 2. Material

### 2.1 Verwendete Materialien

#### Enzyme und Antikörper

Anti-DIG-Flourescein .....	Roche
APAAP .....	Dako
Avidin-Cy3.5 .....	Rockland
Biotin-16-dUTP .....	Roche
DNA-Polymerase I ( <i>E. coli</i> ) .....	New England Biolabs
DNase I .....	New England Biolabs
HaeIII .....	New England BioLabs
HMB45 .....	Dako
Hyp188I .....	New England BioLabs
MOPC 21 .....	Sigma-Aldrich
Mse I 50 U/μl .....	New England Biolabs
MspI .....	New England BioLabs
Panscript Taq-Polymerase .....	PAN Biotech
Pepsin .....	Roche
Proteinase K .....	Roche
T4 DNA Ligase .....	Roche
Tru I .....	MBI Fermentas
TspRI .....	New England BioLabs

#### Chemikalien

AB-Serum .....	Biotest
Acetyliertes bovines Serumalbumin (BSA) .....	Gibco
AcylAmid (29:1) .....	VWR
Agarose .....	Sigma-Aldrich
APS (Amoniumpersulfat) .....	Pharmacia plus one
ATP .....	Roche
BCIP/NBT (AP Color Reagent) .....	BioRad
Big Dye Terminator .....	Applied Biosystems
Blocklösung (Dig Luminescent Detection Kit) .....	Roche
Bromphenolblau .....	Sigma-Aldrich
Colcemid .....	Invitrogen
DAPI .....	Roche
dATP, dCTP, dGTP, dTTP .....	Amersham Biosciences
Digoxigenin-11-dUTP stabil .....	Roche
DNA von humaner Placenta .....	Sigma-Aldrich
DNA-Größenmarker .....	Invitrogen
EDTA .....	Sigma-Aldrich
Eisessig 100 % .....	VWR
Eosin .....	Sigma-Aldrich
Ethanol 70 % und absolut (100 %) .....	AppliChem
Ethanol 80 % (v/v) .....	Roth
Ethidium Bromid .....	Sigma-Aldrich
Eukitt .....	O. Kindler GmbH
FCS .....	PAA Laboratories
Formamid .....	Merck
Hämatoxylinslösung (Mayer's) .....	Sigma-Aldrich
Hank's Salzlösung .....	Biochrom KG

## Material

---

Harnstoff	Sigma-Aldrich
Hering Sperm DNA	Invitrogen
Hi-Di Formamide	Applied Biosystems
Human C0t-1 DNA	Invitrogen
Igepal	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Chemie-Vertrieb GmbH & Co
Kalium-Acetat	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
L-Glutamin	PAA Laboratories
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck
Methanol	Merck
Montagekleber (Fixogum)	Marabu
Natriumazetat (NaAc)	Roth
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck
OnePhorAll plus OPA Plus	Amersham Biosciences
Orange G	Sigma-Aldrich
PCR-Öl	Sigma-Aldrich
PEG 8000 (Polyethylene Glycase 8000)	Promega
Penicillin	PAA Laboratories
Percoll	Amersham Biosciences
Phytohämagglutinin M-From	Invitrogen
RPMI ohne L-Glutamin	PAA Laboratories
Salzsäure (HCl, rauchend)	Merck
Sequenz-Buffer	Applied Biosystems
Streptomycin	PAA Laboratories
SYBR Gold	Invitrogen
SYBR Green Master	Roche
TBE (TRIS-Borat-EDTA-Puffer)	Applichem Lifescience
TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin)	Pharmacia plus one
TRIS	Sigma-Aldrich
Tween 20	Merck
Vaseline	Drogeriemarkt
Vectashield	Linearis
Wasser (LiChrosolv für Chromatographie)	Merck
Xylol	Roth
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

## Geräte

CCD-Kamera (CGH)	Photometrix
CO <sub>2</sub> -Brutschrank	Heraeus 6000
Eismaschine	Scotsman
Feinwaage	satorius laboratory
Gefriertruhe -20 °C und -80 °C	Bosch, Heraeus Instruments GmbH
Heizblock	Eppendorf
Heizplatte	Harry Gestikkeit GmbH
Horizontal + vertikale Gelelektrophorese	Invitrogen/Biozym; Renner
Kryotom	Leica Jung Frigocut 2800 E
Kühlschrank	Bosch
Lasermikroskop	P.A.L.M., Bernried
LightCycler +cLightCycler480-Software	ROCHE
Mikromanipulator	Microinjector 5242, Eppendorf
Mikroskop floureszenz	Zeiss
Mikroskop mit Phasen Kontrast	Zeiss
Mikrotom	Leica RM 2025

## Material

Mikrowelle	Continent
Multipipette	Eppendorf
PCR-Cycler	Biometra
Pipetten	Gilson; Eppendorf
Sequenzier ABI 3100	Applied Biosystems
Spannungsquelle (Agarose-Gel)	EPS 200, Pharmacia Biotech
Sterilbank/Impfbank	Gelaire Flow Laboratoris; Heraeus Instruments
Thermomixer	Eppendorf
Thermoprinter	Sony
Tischzentrifuge, Biofuge pico	Heraeus Instruments GmbH
UV-Schirm	INTAS
UV-Transilluminator	MWG-Biotech
Videokamera (Agarose-Gel)	INTAS
Vortexer	IKA
Wasserbad	Köttermann
Zentrifuge	Heraeus Instruments GmbH

## Verbrauchsmaterialien

96well-Platten	Thermo Scientific
ABI-Reaktionsplatte	Applied Biosystems
Combitips (steril, 0,5 - 12,5 ml)	Eppendorf
Deckgläser 20 x 26 mm	Marienfeld
Einweghandschuhe Classic und Nitril	Meditrade
Eisbehälter	neoLab
Reaktionsgefäße 0,5 - 2 ml (steril, RNase-frei)	Eppendorf
Safe-Lock-Gefäße 0,5 - 2 ml (steril, RNase-frei)	Eppendorf
Falcons 15 ml und 50 ml	Sarstedt; Falcon
Glas-Küvetten	Roth
Glaswaren (Erlenmeyerkolben, Bechergläser)	Schott Duran; Brand
Haft-Objektträger	Micromet
Kulturflaschen 10 ml	Sarstedt
LightCycler480 96 well-Platten	Roche
Objektträger geschnitten, matttrand	Menzel
Papiertücher	Kimberly-Clark
Parafilm	Pechiney Plastic Packing
PCR-Reaktionsgefäße 0,5 + 0,2 ml, ultradünn	Sarstedt
Pipettenspitzen (gestopft, steril, RNase-frei)	Biozym
Pipettenspitzen (steril, RNase-frei)	Sartstedt
Pipetus	Hirschmann Geräte
Polyethylenmembranen	P.A.L.M. Microlaser Technologies
Promega Säulen	Promega
Rührfisch	VWR
Serologische Pipetten (steril) 2 - 25 ml	Sarstedt
Ständer, in jeglicher Größe	Nalgene; Eppendorf
Variopipetten: 0,1-1000 µl	Eppendorf

## Puffer/Lösungen

### PBS (Phosphatbuffer-Saline):

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM
NaCl	150 mM
->pH 7,4	

### SSC (Saline-Sodiumcitrat):

NaCitrat	15 mM
NaCl	150 mM
->pH 7,4	

## Material

### TBE (Tris-Borat-EDTA Puffer):

Tris	89 mM
Borat	89 mM
EDTA	2 mM
->pH 8,3	

### TBS (Tris-Buffer-Saline):

Tris	50 mM
NaCl	150 mM
->pH 7,6	

### Lymphozyten Kulturmedium:

RPMI Medium	250 mL
FCS	37,5 mL
Pen-Strep	5 mL
Glutamin	2,5 mL

### Fixierungslösung:

Methanol	375 ml
Eisessig (100 %)	125 ml

## Oligonukleotide und Primer

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion in München synthetisiert und sind HPLC gereinigt.

**Tabelle 2:      Verwendete Oligonukleotide (Primer)**

Oligonukleotide	Sequenz
LIB1	AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT
ddMse11	TAA CTG ACA G-dideoxy C
p53 Exon 2/3 5'	GAA GCG TCT CAT GCT GGA TC
p53 Exon 2/3 3'	CAG CCC AAC CCT TGT CCT TA
Zytokeratin CK 19 5'	GAA GAT CCG CGA CTG GTA C
Zytokeratin CK 19 3'	TTC ATG CTC AGC TGT GAC TG
D5S500 5'	CTT TTT ACA TTT TTG GTA CCT TG
D5S500 3'	GTA TCG GTG AAA TGC AAC TA
D16S485 5'	AGT AAT AAT GTA CCT GGT ACC
D16S485 3'	AGG CAA TTT GTT ACA GAG CC
B-RAF 5'	TCC AGA CAA CTG TTC AAA CTG
B-RAF 3'	CTC TTC ATA ATG CTT GCT CTG
N-RAS 12/13 5'	GAT GAT CCG ACA AGT GAG AG
N-RAS 12/13 3'	CAA CAG GTT CTT GCT GGT GT
N-RAS 61 5'	GGC AAA TAC ACA GAG GAA GC
N-RAS 61 3'	ACC CCC AGG ATT CTT ACA GA
ATGR (283) F	CAG GAG ATG AGA GTT CCA GA
ATGR (283) R	GTA CCA GGT GCA AGT GTA GC
BlueCone (288) F	CTG TGC TTA CCA AAG GCT TC
BlueCone (288) R	GAC TCT ACC CAG GTT TCT AG
CACNA (233) F	GGT GGC TGT ACG GGT ATA TT
CACNA (233) R	CCT GTG AAG TTT CAG GCT GTC
RUFY2 (458) F	GTT GAG GGC TTC ATC AAC ACC CA
RUFY2 (458) R	CAG CTA GGA ACT CCA GGA ATC A
Granzym B (336) F	AGA CTA TGC ACC TGC CTG GA
Granzym B (336) R	GCC TCC TGG TAA GTT TGC AG
SMYD1 (287) F	GGG TGA CCT GCT TGA CAT C
SMYD1 (287) R	CTT TTC CCT GAA GGT CTT AG
CCND1-A 3'	TGT TGC CCA GAC CCA CGT TT

Oligonukleotide	Sequenz
<b>CCND1-A 5'</b>	CTC CCA CGA AAC GCT ACT TC
<b>CCND1-B 3'</b>	CCC ACG TTT CTT TGC TAC TCA
<b>CCND1-B 5'</b>	TCC CAC GAA ACG CTA CTT CTA
<b>CCND1-C 5'</b>	TGG CGT TCC AGA TTT CAC GGC TG
<b>CCND1-C 3'</b>	AAG TCC TGC ACC TCC ACC CTC TG
<b>CCND1-D 5'</b>	GTC CCC AGA GAC CAG GCT GTG TC
<b>CCND1-D 3'</b>	TGC TAC GCC CCC GAT CAG ATG AA
<b>CCND1-E 3'</b>	AAG CAC AGA CAG CAC CAC AC
<b>CCND1-E 5'</b>	CAG AAC CGC ACA CAG AAA CC
<b>CCND1-F 5'</b>	GGA AGT GTT GAA GGG AGG TG
<b>CCND1-F 3'</b>	CCT GGA AGT CAA CGG TAG CA

### Verwendete Programme und Datenbanken

Mit folgenden Datenbanken und Programmen wurde in dieser Arbeit gearbeitet:

**Datenbanken:** Ensembl, NCBI und OMIN, Cosmic Sanger

**Programme:** Primer3 Design, NCBI Blast, SeqA, NEB-Cutter, Vector NTI oder DNASIS, TreeView, Progenetix

## **2.2 Kooperationspartner und Patientenkollektiv**

Die in dieser Dissertation untersuchten Melanom-Einzelzellen, Primärtumoren und Metastasen (sowie die klinischen Daten zu den einzelnen Patienten) wurden durch den klinischen Kooperationspartner Universitäts-Hautklinik Tübingen, Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Gerhard Fierlbeck und PD Dr. Anja Ulmer bereitgestellt.

Das Patientenmaterial wurde nach vorheriger Genehmigung der Ethikkommission der Universität Tübingen von Patienten mit einem malignen Melanom mit deren schriftlichem Einverständnis in Übereinstimmung mit der Helsinki Erklärung gewonnen. Es gelang eine Melanom-Probenbank (DNA aus Primärtumoren und disseminierten Tumoreinzelzellen aus Wächterlymphknoten) mit Hilfe der Arbeitsgruppe der Universitäts-Hautklinik Tübingen (Prof. G. Fierlbeck und Prof. M. Röcken) aufzubauen.

Insgesamt standen für diese Arbeit 52 Patienten zur Verfügung. Die dazugehörigen Patientendaten sind in den **Tabelle 34** und **Tabelle 35** im Anhang aufgelistet.

Ein Teil der hier verwendeten CGH-Profile wurde bereits in einer medizinischen Doktorarbeit von Murat Yildiz 2007 für die LMU München verwendet. Im Anhang sind daher die eigenen hier entstandenen Profile (n=69) aufgeführt. Für die Auswertungen wurden jedoch alle CGH-Profile (n=81, inkl. NP) verwendet.

## 2.3 SI Einheiten und Anglizismen

### SI Einheiten

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar (µmol/l)
g	Gramm
h	Stunden
L	Liter
M	molar
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar (mmol/l)
nm	Nanometer
nM	nanomolar
s	Sekunden
U	Unit
V	Volt

### Verwendete Anglizismen

Anglizismen sind Begriffe aus der englischen Sprache, die inzwischen Eingang in den deutschen Sprachgebrauch gefunden haben. In der vorliegenden Arbeit werden sie in ihrer ursprünglichen Form verwendet und daher kurz erläutert:

Buffer	Puffer
Cluster	Gruppe, Anhäufung
Cup	kleines Gefäß; Reaktionsgefäß
Kit	Kommerziell erhältliches Materialenset zur Durchführung eines Versuchansatzes
Ladder	Leiter
Pathway	Signalweg
Primer	kurzes synthetisches Oligonukleotid
Peak	Ausschlag, Höchstpunkt



## 3. Methoden

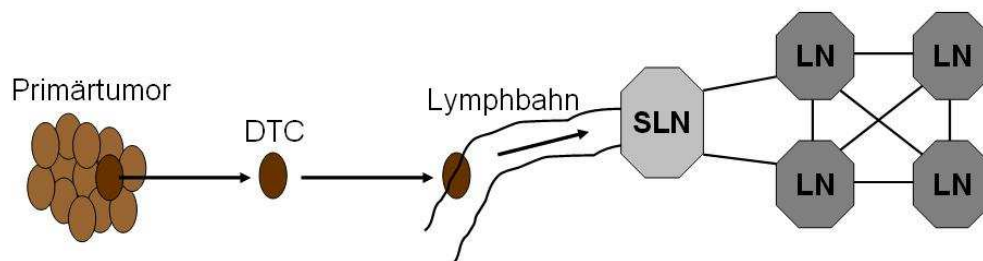
### 3.1 Gewinnung von Patienten Proben

#### 3.1.1 Gewinnung von disseminierten Melanom-Einzelzellen

##### 3.1.1.1 Aufarbeitung der Wächterlymphknoten

##### Wächterlymphknotenbiopsie

Das in der Mitte der 1980-er Jahre von Morton (Morton *et al.*, 1999a+b, 2000 u. 2005) und Mitarbeitern entwickelte Verfahren der Wächterlymphknotenbiopsie (SNB; „sentinal node biopsy“) unter der Vorstellung, dass der Primärtumor bei der Dissemination ein Zwischenstadium einer Mikrometastasierung im so genannten Wächterlymphknoten (SLN; „sentinal lymph node“) aufweist. Der Wächterlymphknoten ist den regionalen Lymphknoten (LN) vorgeschaltet (**Abbildung 4**). Durch die Biopsie und Aufarbeitung dieser Wächterlymphknoten soll eine Erkennung von Patienten erfolgen, die klinisch fälschlich als Stadium I oder II eingeordnet wurden, aber histomorphologisch bereits dem Stadium III angehören. Dieses operative Verfahren wurde in der Universitäts-Hautklinik von Tübingen durchgeführt.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Disseminierung von Tumorzellen via Lymphbahn in den SLN**

Eine Tumorzelle (DTC) löst sich aus dem Primärtumor ab und wandert in die nächstgelegene Lymphbahn ein. Von dort erreicht sie als erstes den Wächterlymphknoten (SLN) vor den regionalen Lymphknoten (LN).

Die DTC wurden durch Percoll-Dichtegradientenzentrifugation der Lymphknoten-Lösung angereichert und anschließend immunhistochemisch angefärbt. Dieser neuer immunzytologischer Ansatz wurde als Nachweis einzelner disseminierter Melanomzellen im Wächterlymphknoten entwickelt (Ulmer *et al.*, 2005). Beides wurde im Labor der Universitäts-Hautklinik von Tübingen standatisiert durchgeführt und wird hier kurz erläutert:

### 3. Methoden

---

Die entnommenen SLN wurden von Geweberesten befreit und mittels eines Skalpells in kleine Stückchen zerkleinert. Diese wurden in ein Nährmedium (RPMI 1640, Penicillin, Streptomycin, FCS und L-Gluthamin) eingelegt und in einer Dako Medimaschine mit rotierenden Klingen zerkleinert. Das Homogenisat wurde mit Hank's Salzlösung aufgefüllt und in Falcon-Zentrifugenröhrchen zentrifugiert, um grobe Verunreinigungen wie Fett und Thrombozyten zu entfernen. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 1x PBS resuspendiert und die Suspension wird vorsichtig mit 60 % Percoll überschichtet und entlang des Dichtegradienten zentrifugiert. Die mononukleären Zellen, zu denen auch die DTC zählen, wurden dabei durch ein Medium mit der Dichte 1,065 g/ml von den Erythrozyten und Granulozyten getrennt. Die mononukleären Zellen, die sich in der Interphase getrennt von den Erythrozyten ansammeln, wurden abgenommen und in ein frisches Röhrchen überführt. Dieses wurde mit 1x PBS gewaschen (der Überstand verworfen) und in PBS resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels der Zählkammer von Neubauer bestimmt. Aus der so gewonnenen Fraktion wurden je 1 Million Zellen/1 ml reversibel auf einem Adhäsions-Objektträger gebunden, um eine spätere Isolation der Zellen durch Mikromanipulation zu ermöglichen. Nach einer Stunde Sedimentation wurde das überständige PBS abgekippt und der Haftobjektträger über Nacht bei RT getrocknet. Das Präparat kann bis zu seiner Verwendung bei 4 °C trocken gelagert werden. Für den immunhistochemischen Nachweis von DTC wurde der monoklonale Antikörper HMB45 verwendet, der eine antigene Determinante eines melanosomalen Proteins erkennt (gp 100). Die Färbungen mit HMB45 haben eine relativ hohe Spezifität und sind in etwa bei 90 % aller Melanome positiv (auf ruhenden Nävuszellverbänden dagegen negativ und daher nützlich für die Differenzialdiagnose Nävus/Melanom). Nach der Rehydrierung der Haft-Objektträger mit 1x PBS wurden die nicht spezifischen Bindungsstellen mit humanem AB-Serum blockiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Primärantikörper HMB45 inkubiert. Danach wurde der Primärantikörper über den Brückenantikörper Z259 mit dem APAAP-Komplex gekoppelt. Bei der Entwicklung der Färbung wurde auf das BCIP/NBT-System zurückgegriffen, da mit anderen Substraten die DNA geschädigt wird. Der enzymatischen Entwicklung mit BCIP/NBT folgt die Fixation mit 1 % PFA. Zwischen den einzelnen Schritten wurde immer dreimal mit 1x PBS gewaschen. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C in 1x PBS. Bei jeder Färbung wurde als Positivkontrolle ein Präparat mit der humanen Melanom-Zelllinie Mel 30 mitgefärbt. Als Negativkontrolle wurde ein Patientenpräparat mit MOPC 21 Antikörper behandelt und anschließend mit Hilfe des APAAP-Komplexes entwickelt. MOPC 21 ist vom gleichen Isotyp wie der Zytokeratin-Antikörper (IgG<sub>1</sub>) und bindet kein humanes Epitop.

#### 3.1.1.2 Isolierung von Melanom-Einzelzellen

Die HMB45-positiven Zellen wurden mittels Mikromanipulation mit einer Glaskapillare von den Haft-Objektträgern isoliert (**Abbildung 11**). Dazu wurden die Haft-Objektträger zunächst mit PBS mit 0,5 %

### 3. Methoden

---

Igepal überschichtet und in ein Invertmikroskop eingespannt. Die einzelnen HMB45-positiven Zellen wurden vorsichtig von der Objektträgeroberfläche gelöst und mit einer Glaskapillare aufgesaugt. Die so isolierten Zellen wurden dann in ein Feld eines 8-Feld-Objektträgers überführt. Von dort erfolgte die Aufnahme der einzelnen gefärbten Zellen in 1 µl PBS mit 0,5 % Igepal. Die anschließende globale Amplifikation der genomischen DNA erfolgte, wie im **Abschnitt 3.1.3** beschrieben.

#### Codierung der Proben

Die Einzelzellen bzw. Areale wurden mit einer bestimmten Codierung versehen. Die erste Zahl gibt den Patienten an. Dann folgt der Tumortyp (PT, DTC oder Met) und die letzte Zahl ist die Probennummer; z.B.: 03 PT 2 bedeutet vom Patienten Nummer 3, Primärtumorareal, Probe 2.

### 3.1.2 Gewinnung von Primärtumoren und Metastasen

#### 3.1.2.1 Schnitte und immunhistochemische Färbung von Primärtumoren und Metastasen

**Die Durchführung erfolgte anhand des Standardprotokolls der Arbeitsgruppe Klein.**

#### Paraffin-Schnitte

Die Primärtumoren und die Metastasen wurden nach der OP an der Universitäts-Hautklinik Tübingen in Paraffin eingebettet. Von diesen Paraffin-Blöcken wird mit Hilfe eines Kryotoms 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Diese wurden einmal für die Laserdissektion auf Polyethylenmembran-Objektträger und die dazugehörigen Referenzschnitte auf normale Glasobjektträger gebracht. Die Polyethylenmembran-Objektträger wurden vor dem Gebrauch 30 Minuten lang unter UV-Licht gelegt, um Verunreinigungen zu entfernen. Damit die Paraffinschnitte auf den Objektträgern haften bleiben, wurden die Objektträger über Nacht bei 60 °C gebacken.

#### Hämatoxylin/Eosin-Färbung für Paraffinschnitte

Die Hämatoxylin/Eosin (H/E)-Färbung wurde nur auf den Referenzschnitten verwendet. Die Schnitte zur Mikrodisektion wurden nur Hämatoxylin gefärbt (**Abbildung 12 B**). Als Erstes wurden die Paraffinschnitte 2 mal 10 Minuten mit 100 %igem Xylol deparaffinisiert. Nach einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 85 %, 75 % - 2 min pro Lösung) und 2 Minuten in destilliertem Wasser, erfolgte die Kernfärbung mit der Hämatoxylinlösung (0,1 %) für 2 Minuten. Die Hämatoxylinlösung wurde abgekippt und der Objektträger in destilliertem Wasser gespült und 10 Minuten in Leitungswasser zur Blaufärbung eingelegt. Die Referenzschnitte wurden zusätzlich mit Eosin (0,1 %) gefärbt. Dieser Schritt entfällt bei den Schnitten zur Mikrodisektion, um negative Einflüsse auf die primäre PCR zu

### 3. Methoden

---

vermeiden. Zur Dehydrierung folgte eine aufsteigende Ethanolreihe (75 %, 85 %, 100 % - 2 min pro Lösung). Die Folienschnitte wurden abschließend über Nacht bei 37 °C getrocknet und die Referenzschnitte wurden mit Eukitt eingedeckelt und bei RT als Kontrolle gelagert.

#### 3.1.2.2 Mikodissektion von Arealen

Die malignen Primärtumor- und Metastasen-Areale wurden auf den Referenzschnitten aufgesucht um die entsprechenden Gebiete auf den Folienschnitten auszumachen (ein Pathologe des Instituts der Pathologie Regensburg stand zur Überprüfung zur Verfügung). Mittels eines PALM-Laser-Microbeam-Systems wurden die gewünschten Areale durch den Laser in den Deckel eines Reaktionsgefäßes mikrodissiziert (**Abbildung 11 C**). In diesem Deckel befanden sich 3 µl PCR-Öl, damit das gelaserte Areal im Deckel kleben bleibt. Insgesamt wurden 200.000 µm<sup>2</sup> große Gewebeareale pro Probe gelasert. Die globale Amplifikation der genomischen DNA erfolgte wie im **Abschnitt 3.1.3** beschrieben.

#### 3.1.2.3 Kontroll-Zellen

Als Kontroll-Zellen dienten von gesunden Spendern isolierte Lymphozyten (interne Kontroll-Zellen der AG Klein). Aus PBMC wurden die Erythrozyten mittels Percoll-Dichtezentrifugation (60 %) entfernt und die Lymphozyten als Einzelzellen gepickt. Mit diesen Zellen wird die primäre PCR (**Abschnitt 3.1.3**) durchgeführt und anschließend eine Kontroll-PCR (**Abschnitt 3.1.4**) gemacht. Nur Zellen, die CK19 und Exon2/3 positiv waren wurden als interne Kontrollen verwendet (z.B. für die qPCR, SSCP). Diese Einzelzellen wurden zudem noch in einem großen Zellpool vermengt (30 µl pro Zelle und 10 Zellen pro Mensch) und anschließend aliquotiert. Somit stehen Kontroll-Einzelzellen und Kontroll-Zellpools zur Verfügung. Bei jedem Versuchsansatz (z.B. SSCP) liefen Kontroll-Einzelzellen und Kontroll-Zellpools als interne Kontrollen immer mit.

#### 3.1.3 Primäre PCR

Mit der von der AG Klein (Klein *et al.*, 1999) entwickelten Mse-Adapter-PCR wurden die isolierten Melanom-Einzelzellen, die Primärtumor- und die Metastasenareale global amplifiziert:

##### Proteinase K Verdau

- a) Für gepickte Einzelzellen wurde 2 µl Proteinase K Mix in ein 200 µl Reaktionsgefäß pipettiert, in die die aufgenommene Einzelzelle hineingegeben wurde. Anschließend wurden die zellulären Proteine über 10 h bei 42 °C verdaut.
- b) Für die gelaserten Areale wurde 4,5 µl Proteinase K Mixes hinzugegeben und über 15 h bei 42 °C verdaut.

### 3. Methoden

Nach dem Verdau folgte eine 10 minütige Inaktivierung der Proteinase K bei 80 °C.

Reagenzien des Protein K Mix	Volumen
OnePhorAll plus Puffer	5 µl
Igepal 10 %	1,3 µl
Tween 10 %	1,3 µl
Proteinase K (10 mg/ml)	2,6 µl
ddH <sub>2</sub> O	34,8 µl
Endvolumen	45 µl
Benötigtes Volumen für Einzelzelle	2 µl
Benötigtes Volumen für gelaserte Areale	4,5 µl

#### MseI Verdau

Das Genom der Melanom-Zellen (Einzelzelle oder Areal) wurde mit dem Restriktionsenzym MseI (5'...T!TAA ...3') geschnitten und gleichzeitig an den 5'-Enden ein TA-Überhang generiert. Der Restriktionsverdau lief bei 37 °C über 3 h in einer PCR-Maschine, indem der mit Proteinase K vorbehandelten Probe folgende Reagenzien (2 µl/Tube) hinzugefügt wurden:

Reagenzien	Volumen
MseI (50 U/µl)	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	1 µl
Endvolumen	2 µl

Nach dem Verdau wurde das MseI Enzym bei 65 °C inaktiviert (5 min).

#### Preannealing der Adapter

Ein Adapter aus den zwei Oligonukleotiden LIB1 und ddMse11 (HPLC gereinigt) wurde an die durch den Verdau generierten Überhänge ligiert. In ein neues Reaktionsgefäß kamen 3 µl des folgenden Ansatzes:

Reagenzien	Volumen
OnePhorAll plus Puffer	0,5 µl
LIB1 Primer (100 µM)	0,5 µl
ddMse11 Primer (100 µM)	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	1,5 µl
Endvolumen	3 µl

Die Basenpaarung des Adapters wurde dabei durch ein langsames Abkühlen in der PCR-Maschine nach einem programmierten Gradienten (65 °C bis 15 °C für je 1 Minute pro Temperaturschritt) vor der Ligation erzielt.

#### Ligation

Zu der mit Mse I fragmentierten Probe wurde der vorbehandelte Adapter, sowie 1 µl T4 DNA-Ligase (5 U) und 1 µl ATP (10 mM) gegeben. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 15 °C (mindestens 8 h).

### 3. Methoden

#### **Primäre PCR**

Das mit den an den Adapter ligierten MseI-Fragmenten gefüllte Reaktionsgefäß wurde mit 40 µl des folgenden PCR-Mix aufgefüllt:

Reagenzien PCR-Mix	Volumen
Expand-Long-Template Puffer 1	3 µl
10 mM dNTP	2 µl
Expand-Long-Template Polymerase Mix (3,5 U/µl)	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	35 µl
Endvolumen	41 µl

Somit war ein Endvolumen von ca. 50 µl pro Probe erreicht. Um die 3'-rezessiven Enden der Fragment-Adapter-Konstrukte aufzufüllen, wurde das Reaktionsgemisch als erstes für 3 min bei 68 °C inkubiert. Durch diesen Schritt entstehen komplementäre LIB1-Primerbindungsstellen. Am Ende der PCR wurde das Reaktionsgemisch auf 4 °C abgekühlt. Das so entstandene primäre PCR-Produkt war bei -20 °C stabil und diente als Ausgangsmaterial für die weiteren Untersuchungen. Die PCR-Maschine wurde wie folgt programmiert:

Temperatur	1 Zyklus	14 Zyklen	8 Zyklen	22 Zyklen	1 Zyklus
94 °C		40 sec	40 sec	40 sec	
57 °C – 65 °C		57°C / 30 sec	57°C / 30 sec + 1°C/Zyklus	65°C / 30 sec	
68 °C	3 min	1 min 30 sec + 1 sec/Zyklus	1 min 45 sec + 1 sec/Zyklus	1 min 53 sec + 1 sec/Zyklus	3 min 40 sec

#### **3.1.4 Kontroll-PCR**

Um die Qualität des primären PCR-Produktes zu bestimmen, wurden spezifische genomische MseI Fragmente nachgewiesen. Dazu wurden für die primären PCR-Produkte der DTC die Primerpaare TP53 (p53 Exon 2/3) und Keratin 19 Pseudogene 1 (CK 19; Pseudogen KRT19P1) verwendet (Sequenz s.

**Tabelle 2**). Für die PT- und Met-Areale wurden die Mikrosatellitenmarker D5S500 und D16S485 verwendet, da die DNA bei der Gewinnung aus Paraffingewebe zum Teil in kleineren Fragmenten vorlag. Der PCR-Master-Mix zum Nachweis der Qualität bestand aus:

Reagenzien Master-Mix	Volumen
PCR Puffer (10 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM Tris; pH 8.5, 500 mM KCl, 1 mM dNTP)	1 µl
3'-Primer	0,5 µl
5'-Primer	0,5 µl
BSA	0,25 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
ddH <sub>2</sub> O	7,25 µl
Endvolumen	9,6 µl

### 3. Methoden

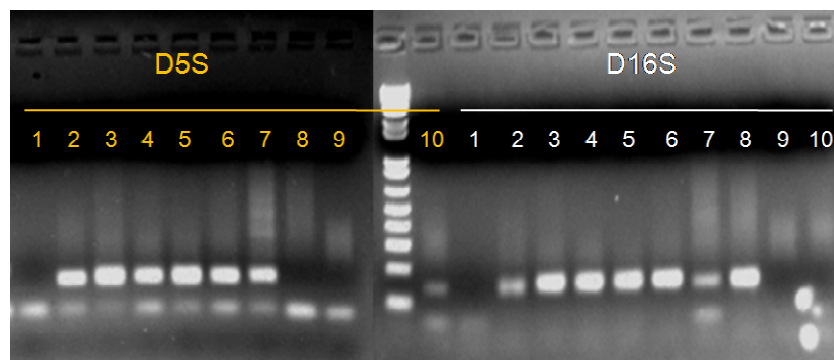
Für die Kontroll-PCR wurden 9,5 µl Master-Mix und 0,5 µl der zu untersuchenden Probe des primären PCR-Produktes zusammengemischt. Die PCR-Maschine wurde wie folgt programmiert:

Temperatur	1 Zyklus	15 Zyklen	25 Zyklen	1 Zyklus
94 °C	2 min	15 sec	15 sec	
58 °C	30 sec	30 sec	30 sec	
72 °C	2 min	20 sec	30 sec	2 min

Bei zwei positiven spezifischen Kontroll-PCR Ergebnissen konnte man von einer qualitativ guten Ausgangsprobe ausgehen. Wenn sich kein positives Ergebnis in der anschließenden Gelelektrophorese zeigte, konnte die Probe nicht weiter verwendet werden (**Abbildung 5**).

#### 3.1.5 Gelelektrophorese

Nach jeder durchgeführten PCR wurden die Produkte durch eine Gelelektrophorese mit einem 1,5 %igen Agarosegel (in TBE-Puffer mit EtBr) kontrolliert (z.B. **Abbildung 5**). Dazu wurde jede Probe mit 2 µl Orange G versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Proben wurden durch 160 V und 400 mA über 45 min aufgetrennt. Um die Bandengröße festzustellen wurde ein 1 kb Marker mit aufgetragen, sowie jeweils eine positiv und eine negativ Kontrolle. Die so entstandenen Banden wurden unter einem UV-Licht sichtbar gemacht und das Gel mit einer Kamera fotografiert und archiviert.



**Abbildung 5: Gelelektrophoresebild einer Kontroll-PCR von Metastasen-Proben**

Gelb markiert die Kontroll-PCR mit D5S500 (D5S). Weiß markiert die Kontroll-PCR mit D16S485 (D16S). In der Mitte befindet sich ein Standard 1 kb Marker. Die Proben 2-7 sind hier für beide Kontroll-PCR positiv und wurden weiter verwendet. Die Proben 1, 9 und 10 zeigten kein positives Kontroll-PCR Ergebnis, sowie die Probe 8 (nur in der D16S PCR positiv). Diese Proben wurden nicht weiter verwendet.

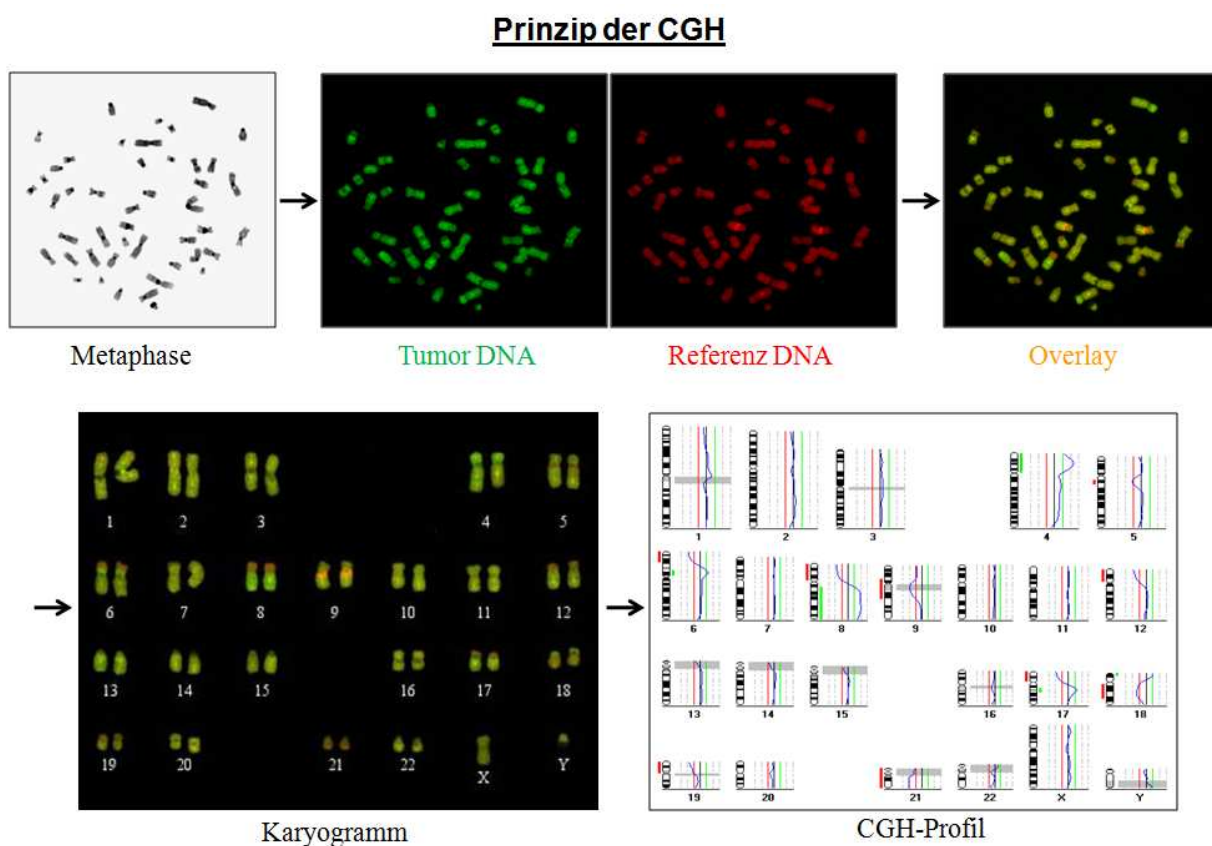
### 3.2 Komparative Genomische Hybridisierung (CGH)

Die CGH - Comparative Genomic Hybridisation (vergleichende genomische Hybridisierung) - ist eine Methode um genetische Veränderungen festzustellen. Sie erlaubt numerische Unterschiede, Deletionen und Amplifikationen einzelner Chromosomen oder Chromosomenabschnitte festzustellen und ist daher als Screeningmethode für diese Arbeit geeignet. Durch die vergleichende Hybridisierung

### 3. Methoden

(*in situ*) verschiedenfarbig markierter Genome auf einer Kontrollmetaphase können genomische Imbalancen zwischen den zwei Genomen detektiert werden. Bei der CGH hybridisieren Tumor-DNA und Referenz-DNA gesunder Spender konkurrierend auf die Metaphasen Chromosomen. Deletionen und Amplifikationen werden durch Unter- bzw. Überrepräsentation einer Hybridisierungssonde auf den betreffenden Chromosomenregionen sichtbar. Dazu wird die komplette genomische DNA als Hybridisierungssonde verwendet. Auf diese Weise können in einem einzigen Hybridisierungsvorgang alle Veränderungen innerhalb eines Genoms detektiert werden, die mit einem Zugewinn (Amplifikation) oder Verlust (Deletion) von DNA-Sequenzen einhergehen (**Abbildung 6**).

Die Durchführung erfolgte anhand des Standardprotokolls der Arbeitsgruppe Klein.



**Abbildung 6: Prinzip der komparativen genomischen Hybridisierung**

Auf humane Metaphasen gesunder Spender hybridisiert man zwei unterschiedlich markierte DNA-Proben (Tumor-DNA und Referenz-DNA aus einem Lymphozyten-Pool aus dem peripheren Blut). Diese werden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen und zu einem Overlay Bild zusammen gelegt. Die Chromosomen können dann in einem Karyogramm-Schema eingeordnet werden. Das CGH-Profil zur Darstellung chromosomaler Veränderungen wird anschließend vom Computer berechnet.



#### **3.2.1 Metaphasen-Präparation**

##### **Gewinnung von Metaphasenchromosomen**

Um Metaphasenchromosome zu gewinnen, wurde 20 ml frisch heparinisiertes peripheres Blut von einem gesunden männlichen Spender (Y-Chromosom) verwendet. Das Blut wurde mit einem Lymphozyten-Kulturmedium gemischt. Hinzu kamen 3 ml Phytohemagglutinin, um die Zellteilung einzuleiten (und Agglutinierung der Erythrozyten). Dieses Gemisch wurde auf 10 ml Kulturflaschen verteilt und über 72 h im CO<sub>2</sub>-Brutschrank bei 37 °C inkubiert (Tag 2 und 3). Einmal am Tag wurden die Kulturflaschen geschwenkt, damit die Zellen im Medium bleiben. Um die Zellteilung der Lymphozyten in der Metaphase zu arretieren, wurden den Kulturflaschen eine Stunde vor Ende der Inkubationszeit je 100 µl Colcemidlösung (Stockkonzentration 10 µg/ml) zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Kulturen wurden dann in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und zentrifugiert (10 min; 1500 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit 10 ml hypotoner Lösung (75 mM KCl) resuspendiert (vorsichtiges vortexen) und für 8 min bei 37 °C inkubiert. Durch diesen Schritt quellten die Lymphozyten auf und wurden noch mal abzentrifugiert (10 min; 1500 rpm). Überstand wurde wieder verworfen. Anschließend wurde das Pellet vorsichtig mit eiskaltem Fixativ (Methanol-Eisessig; immer frisch angesetzt) resuspendiert. Es folgte ein zweimaliges Zentrifugieren und Waschen mit 10 ml Fixativ um die Zellreste der Erythrozyten zu entfernen. Die so gewonnene Lymphozytensuspension konnte in 10 ml Fixativ (15er Falcon) bei -20 °C für mehrere Monate gelagert werden.

##### **Präparation von Metaphasenchromosomen**

Zur Herstellung der Metaphasen-Objektträger wurden die Objektträger über Nacht bei 4 °C in 100 %igem Ethanol in einer Küvette entfettet und gereinigt. Das Ethanol wurde dann abgegossen und die Objektträger in destilliertem Wasser bei -20 °C abgekühlt (5-10 min). Die in Methanol-Eisessig fixierten Lymphozyten wurden bis zum Gebrauch mit den Objektträgern auf Eis gestellt. Die Lymphozytensuspension wurde abzentrifugiert (10 min; 1500 rpm) und der Überstand verworfen (ca. 2-3 ml bleiben übrig). Dann wurde die Lymphozytensuspension mittels einer abgeschnittenen 200 µl Pipettenspitze aus einem Abstand von zirka 50 cm Höhe auf die Objektträger aufgetropft. Durch eine mikroskopische Kontrolle (20x und Phasen Kontrast) der schon aufgetropften Metaphasen konnten die Anzahlen der Tropfen und die Höhe angepasst werden. Es sollten genug Metaphasen zum Auswerten auf dem Objektträger vorhanden sein (>20). Die Metaphasen sollten keine cytoplasmatischen Tropfen aufweisen, eine dunkel graue Färbung haben, scharfe Ränder und nicht übereinander oder zu weit auseinander liegen. Auf einer Heizplatte (ca. 45 °C) wurden feuchte Tücher ausgelegt, auf diese kamen die Objektträger für 2-3 Stunden zum Trocknen (die hohe Luftfeuchtigkeit

### 3. Methoden

war gut für ein besseres Ausbreiten der Metaphasen Chromosomen; Alterungsprozess der Chromosomen). Sobald das Fixativ verdampft war, wurden die nun fertigen Metaphasen-Objektträger beschriftet und in 70 %igem Ethanol bei 4 °C in einer Küvette mit Parafilm aufbewahrt (6 Monate Maximum) und waren nach drei Tagen verwendbar.

#### 3.2.2 Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)

##### Markierung von Patientenprobe und Referenzprobe

Die Produkte der primären PCR wurden in Anwesenheit von Desoxynukleotid-Derivaten reamplifiziert. Die Patienten-Probe wurde mit Digoxigenin-11-dUTP und die Referenz-Probe mit Biotin-16-dUTP markiert. Diese Desoxynukleotid-Derivate ersetzen einen Teil der Thymidinbasen. Die Reamplifikate konnten so später über Fluoreszenz auf den Metaphasen nachgewiesen werden.

Reagenzien Reamplifikationsansatz	Volumen
Expand-Long-Template Puffer 1 (Roche)	4 µl
LIB1 (10 µM)	8 µl
7/8 dNTP-Mix	1,5 µl
Referenz: Biotin-16-dUTP (1 mM) Patient: Digoxigenin-11-dUTP (1 mM)	1,75 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,75 µl
ddH <sub>2</sub> O	24,25 µl
Endvolumen	40 µl

Zu dem aufgelisteten Reamplifikationsansatz wurde 1 µl des primären PCR-Produkts (Referenz-DNA bzw. Patienten-DNA) als Template hinzugegeben. Die in dieser Arbeit verwendeten Proben wurden gleichgeschlechtlich gelabelt (die bereits vorhandenen CGH-Profile von Murat Yildiz, die zur CGH-Auswertung mit reingenommen wurden, wurden dagegen gegengeschlechtlich gelabelt; bei der Auswertung zu beachten). Die PCR-Maschine wurde wie folgt programmiert:

Temperatur	1 Zyklus	10 Zyklen
94°C	1 min	30 sec
60°C	30 sec	30 sec
72°C	2 min	2 min + 20 sec pro Zyklus

Nach der Reamplifizierung wurde der LIB1 Primer durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym Tru I abgetrennt. Tru I ist ein Isozym von Mse I (Schnittstelle T!TAA) und wurde wegen möglichen Interferenzen bei der CGH verwendet. Zu dem Reamplifikationsansatz wurden 1 µl Tru I (50 U/µl) und 2 µl Puffer R hinzugegeben. Die Inkubation mit dem Restriktionsenzym betrug 3 Stunden bei 65 °C.

### 3. Methoden

#### **Vergleichende genomische Hybridisierung**

Die markierten Reamplifikate wurden über Nacht zusammen bei -20 °C mit dem folgendem Cot-1-DNA Mix gefällt:

Reagenzien für Cot-1-DNA Mix	Volumen
Digoxigenin-markierte Proben-DNA	ca. 44,5 µl
Biotin-markierte Referenz-DNA	ca. 44,5 µl
Cot-1-DNA (1 µg/µl)	80 µl
Heringsperm-DNA (10µg/µl)	10 µl
NaAC (3M, pH 5.2)	18 µl
EtOH 100 % (-20 °C, unvergällt)	400 µl
Endvolumen	ca. 597 µl

Die Cot-1-DNA diene dabei der Absättigung hochrepetitiver DNA-Sequenzen im Bereich des Heterochromatins. Repetitive DNA-Abschnitte, wie sie z.B. im Bereich der Chromosomenzentromeren vorkommen, haben eine unterschiedliche Hybridisierungskinetik im Vergleich zu einmalig vorkommenden Sequenzen und verursachen ohne Zugabe von Cot-1-DNA ein sehr starkes Fluoreszenzsignal, welches die digitale Bildauswertung beeinträchtigen würde.

Anschließend wurde die gefällte DNA bei 4 °C und 14.000 rpm für 45 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 700 µl EtOH (70 %, unvergällt) gewaschen. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 14.000 rpm für 10 min (bei RT). Der Überstand wurde nun sorgfältig abgezogen und das Pellet bei 42 °C getrocknet. Das Pellet wurde im Thermoblock bei 42 °C für 45 min mit 6 µl Formamid unter schütteln gelöst. Dann wurden 6 µl Mastermix 30 (4x SSC; 30 % Dextran Sulfat Mr > 500.000), hinzugegeben und für weitere 30 min bei 42 °C inkubiert. Die anschließende Denaturierung der DNA erfolgte bei 78 °C für 6 min in einem weiteren Thermoblock. Um eine unspezifische Bindung der Proben auf die Metaphasen zu verhindern, gab man der Cot-1-DNA 30 min Zeit sich mit repetitiven Sequenzen der Proben-DNA bzw. Referenz-DNA zu hybridisieren. Dieser Schritt erfolgte in einem 37 °C warmen Wasserbad. Parallel wurde ein geeigneter Metaphasen-Objektträger von Zytoplasmaresten und RNA befreit und die vorhandene DNA denaturiert. Dazu wurde der Metaphasen-Objektträger in 2x SSC hydriert (5 min, RT). In einem 37 °C warmen Wasserbad werden 100 ml HCl (10 mM, pH 2.0) erwärmt und dann mit 50 µl Pepsin-Lösung (Stockkonzentration 100 mg/ml in Wasser) versetzt. In diese HCl-Pepsin-Lösung wurden die Metaphasen-Objektträger für 3-4 min (je nach Ausmaß der Zytoplasmareste) bei 37 °C inkubiert. Der Pepsin-Verdau wurde durch dreimaliges Waschen mit 1x PBS (pH 7.4, RT) gestoppt. Anschließend folgte eine aufsteigende kalte EtOH-Reihe (70 %, 85 %, 100 %, vergällt, -20 °C) für jeweils 3 min zur Dehydrierung der Objektträger. Die Objektträger wurden dann auf einer Heizplatte (ca. 40 °C) an der Luft getrocknet. Zur Denaturierung der DNA, wurden die Objektträger für 1 min und 45 sek (bis 1 min und 55 sek) in der 70 °C heißen Denaturierungslösung (70 ml 100 % Formamid, 10 ml 20x SSC, 20 ml Wasser, eingestellt

### 3. Methoden

---

auf pH 7,5) inkubiert. Gefolgt von einer aufsteigenden kalten EtOH-Reihe für jeweils 3 min. Als letztes wurden die Metaphasen-Objektträger auf der Heizplatte (ca. 40 °C) getrocknet. Nun wurden die 12 µl der vorbehandelten Proben luftblasenfrei auf die Metaphasen-Objektträger aufgetragen. Das Hybridisierungsfeld wurde durch ein 18x18 mm großes Deckgläschen abgedeckt und mit Fixogum verschlossen. Die Hybridisierung erfolgte über 2 Nächte in einer feuchten Kammer bei 37 °C im Dunklen. Nun konkurrieren die markierten einzelsträngigen DNA-Fragmente beider Proben (Referenz und Patient) um freie Bindungsstellen an den komplementären DNA-Sequenzen der normalen Metaphasenchromosomen und binden sich entsprechend ihrer Häufigkeit. Nach der Hybridisierung wurde das Deckgläschen mit dem Fixogum vorsichtig von den Objektträgern gelöst. Die Hybridisierungslösung wurde mit 4x SSC / 0,2 % Tween (pH 7.4) durch kräftiges schütteln vom Objektträger entfernt (4mal). Danach folgte ein dreimaliges Waschen mit 1x SSC (pH 7.4) bei 60 °C und einmal mit 1x PBS / 0,2 % Tween (pH 7.4) bei 42 °C. Um die Proteinbindungsstellen auf dem Metaphasen-Objektträger zu blockieren wurden diese mit 1 ml Block 3 %-Lösung (1x PBS pH 7,5, 0,2 % Tween, 3 % BSA Fraktion V, 5 % FCS) überschichtet und für 30 min in der feuchten Kammer (37 °C) inkubiert. Die überschüssige Block-Lösung wurde mit 1x PBS / 0,2 % Tween bei 42 °C abgewaschen. Der Objektträger wurde einer Antikörper-Lösung aus FITC und Cy 3.5 (20 µl Anti-Digoxigenin-FITC, 2 µl Avidin-Cy 3.5 und 185 µl 1 % Superblock-Lösung (1x PBS pH 7,5, 0,2 % Tween, 1 % BSA Fraktion V, 5 % FCS) für 45 min bei 37 °C im Dunklen, von einem Deckglas (24 x 55 mm) abgedeckt, in der feuchten Kammer inkubiert. In den Metaphasenchromosomen wurde so eine Mischfarbe induziert, die je nach Zugewinn oder Verlust von DNA Sequenzen des zu untersuchenden Genoms in den betreffenden Chromosomenabschnitten nach Grün bzw. Rot abweicht. Nach der Inkubation wurde die Antikörper-Lösung durch dreimaliges Waschen mit 4x SSC / 0,2 % Tween (42 °C) auf dem Schüttler im Dunklen herunter gewaschen. Um die Chromosomen später einander zuordnen zu können wurde der Metaphasen-Objektträger nach der Inkubation noch mit einem spezifischen dritten (blauen) Farbstoff DAPI für AT-reiche Sequenzen für zwei Minuten gegengefärbt (1 ml 4x SSC / 0,2 % Tween + 10 µg DAPI). Der Objektträger wurde kurz mit destilliertem Wasser gespült, um bei der Trocknung die Bildung von Salzkristallen zu verhindern und schließlich unter Vectaschild luftblasenfrei eingedeckelt.

#### 3.2.3 Auswertung der CGH

##### Visualisierung

Die Färberesultate der Zielchromosomen wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops visualisiert und die Qualität der Hybridisierung anhand definierter Kriterien beurteilt. Dabei wurden zunächst mit einer CCD-Kamera (charge-coupled device) 10 bis 15 geeignete Metaphasen mit den Fluoreszenzfiltern DAPI, FITC und Cy 3.5 fotografiert und in digitalisierten Bilderserien gespeichert.

#### Der Vergleich

Das für die blaue DAPI-Fluoreszenz spezifische Bild wurde extrahiert, in ein Schwarzweißbild überführt, negativiert und kontrastverstärkt. Auf diese Art und Weise wurde auf den Chromosomen ein G-Band-ähnliches Muster sichtbar, so dass sie eindeutig identifiziert werden konnten. Mit dem Cy 3.5 Fluoreszenzfilter erhielt man ein Bild mit einer roten Metaphase, dies entsprach der Referenz-DNA. Die Patienten-DNA war mittels dem FITC Fluoreszenzfilter (grünes Metaphasen Bild) ermittelbar (**Abbildung 6**). Desweiteren kann man hier auch den Verlust oder Zugewinn ganzer Chromosomen beurteilen. Die Chromosomen wurden computergestützt erkannt und zu einem Karyogramm ausgelegt. Am Computer erfolgte mit der entsprechenden Software (Leica QCGH) nun eine Überlagerung der zwei Fluoreszenzaufnahmen von Patienten-Probe und Referenz-DNA. Nachdem man anhand des DAPI Bildes die Chromosomen am PC sortiert hatte, verglich der Rechner die Intensitäten der zwei Fluoreszenzen von Test- und Normal-DNA miteinander. Nach dem Angleichen der mittleren Fluoreszenzintensitäten von Grün- und Rot-Bild (Normalisierung) wurde, beginnend vom Telomer des kurzen Armes entlang der medianen Achse eines jedes Chromosoms, das Verhältnis der Intensitäten von Grün- und Rotfluoreszenz gemessen. Dabei wurde die Messung an jedem Punkt der Achse über die gesamte Breite des Chromosoms integriert. So wurde für jedes Chromosom ein Verhältnisprofil der Fluoreszenzintensitäten (CGH-Ratioprofil) erstellt, an dem relative Zugewinne und Verluste von DNA-Sequenzen in den entsprechenden chromosomalen Abschnitten in Form einer Verschiebung des Ratioprofils abzulesen waren. Die CGH-Software reduzierte unerwünschte Rauscheffekte durch Generierung eines Summeninterpreters aus durchschnittlich 15-20 CGH-Profilideogrammen. Die Festlegung der Schwellenwerte für Gewinne und Verluste erfolgte für jede Hybridisierung individuell. Ist nun z.B. die rote Fluoreszenz stärker (unter 0.75) als die grüne, wies das auf eine Deletion (einen Verlust eines Chromosomen Abschnittes) der Tumorzelle hin. Im umgekehrten Fall (über 1.25) lies auf eine Amplifikation (einen Zugewinn eines chromosomalen Abschnittes) schließen. Zur Beschreibung der Veränderungen wurde die Nomenklatur für humane Chromosomen für die in-situ-Hybridisierung (Mitelman, 1995 = ISCN 1995) herangezogen. Aberrationen an bestimmten Chromosomenregionen sind kritisch zu bewerten und flossen nur in Einzelfällen (u.a. 1p32pter und 19) in die Auswertung ein. Veränderungen an diesen Stellen gelten als besonders artefaktanfällig und werden häufig falsch positiv als Verluste gewertet. Unter die darüber hinaus schwierig einzuordnenden Abschnitte fallen zudem die Heterochromatin-Bereiche an 1q12, 9q12, 16q11.2 und 15p sowie die Zentromer- und Telomerbereiche und p-Arme der akrozentischen Chromosomen (13, 14, 15, 21, 22; Kallioniemi A *et al.*, 1992, Kallioniemi OP *et al.*, 1993). Veränderungen in den repetitiven Bereichen eines Chromosoms (z.B. die Zentromer- und Telomerbereiche) wurden nicht gewertet (Kallioniemi OP *et al.*, 1994). Alle hier gewonnenen CGH-Profile sind im **Anhang Abschnitt 10.3.2** aufgeführt.

#### **Progenetix**

Mittels dem freien Internet Programm von Progenetix (Baudis, [www.progenetix.de](http://www.progenetix.de)) wurden die ermittelten CGH-Ratioprofile der einzelnen Proben in die jeweiligen zu untersuchenden Gruppen (Primärtumor, disseminierte Tumoreinzelle und Metastase) zusammengefasst und analysiert. Die CGH-Ratioprofile wurden dazu in eine Microsoft-Excel-Tabelle übertragen. Gewinne und Verluste der einzelnen Chromosomenregionen wurden dabei mit einem Zahlenwert ausgedrückt (+1 Gewinn, 0 keine Veränderung, -1 Verlust). Diese Tabelle wurde dann in die rev ish enh/dim Schreibweise umgewandelt, die dann als Textdatei abgespeichert wurde. Die auf diese Weise generierte Datei wurde in das Progenetix-Programm eingelesen. In dem erhaltenden Ideogramm der jeweiligen Gruppe wurden die Gewinne (Grün) und Verluste (Rot) prozentual nach dem Auftreten angezeigt (s. **Abschnitt 10.3.1 im Anhang**). Für diese Auswertung wurde eine 395 Chromosomen-Bänderung verwendet.

#### **3.2.4 Hierarchische Cluster-Analyse**

Als Hierarchische Cluster-Analyse (Ähnlichkeitsanalyse) bezeichnet man eine bestimmte Familie von distanzbasierten Verfahren zur Cluster-Analyse (Strukturentdeckung in Datenbeständen). Die Analyse der CGH-Daten erfolgte mit der kostenfrei auf der Internetseite von Michael Eisen (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>) erhältlichen Cluster und TreeView Software (Eisen *et al.*, 1998). Die Durchführung erfolgte durch das dazugehörige Manual. Hier nur kurz erläutert:

Die CGH-Daten wurden in eine Excel-Tabelle eingetragen, die dann als Textdatei gespeichert wurde. Für die hierarchische Ähnlichkeitsanalyse (Cluster-Analyse) wurden die Normalprofile nicht mit einbezogen. Die Amplifikationen (Gewinne) und Deletionen (Verluste) der einzelnen Chromosomenregionen wurden dabei mit einem Zahlenwert ausgedrückt (+3 Gewinn, 0 keine Veränderungen und -3 Verlust). Diese Tabelle wurde dann als Textdatei abgespeichert. Die auf diese Weise generierte Datei konnte in das Cluster-Programm eingelesen werden und die Daten konnten nach der Complete-Linkage-Methode oder nach der Average-Linkage-Methode gruppiert werden. Das Complete Linkage Verfahren verwendet den größten Wert aus dem Cluster zur Bestimmung der neuen Abstände zu den anderen Proben (alternativ die „Average Linkage“ Methode). Das Ergebnis der hierarchischen Gliederung der Daten konnte dann in TreeView sichtbar gemacht werden, wobei die Farbe Grün die Gewinne (+3) und Rot die Verluste (-3) anzeigt. Gleichzeitig wurde zu den Daten ein Dendrogramm angelegt. Das Dendrogramm ist ein Baum, der die hierarchische Zerlegung der Datenmenge in immer kleinere Teilmengen darstellt, wobei der Abstand zu den am nächsten stehenden Knotenpunkten die Ähnlichkeit zwischen zwei Proben angibt. Im Dendrogramm sind sich also benachbarte Datensätze besonders ähnlich, wobei diese Vereinfachung nicht an den Grenzen übergeordneter Bäumchen gilt.

Um auf den großen Chromosomen keine wichtige Information zu verlieren, wurden in dieser Arbeit die einzelnen Chromosomen in möglich kleine Abschnitte (n=54) unterteilt. Auf diesem Wege konnten Fehler bei der Ähnlichkeitsanalyse verhindert werden, da zum Beispiel eine Deletion am proximalen Ende eines Chromosomenarms nicht mit einer am distalen Ende gleichgesetzt wurde.

## 3.3 Mutationsanalyse mittels der SSCP-Analyse

### 3.3.1 Template spezifische PCR

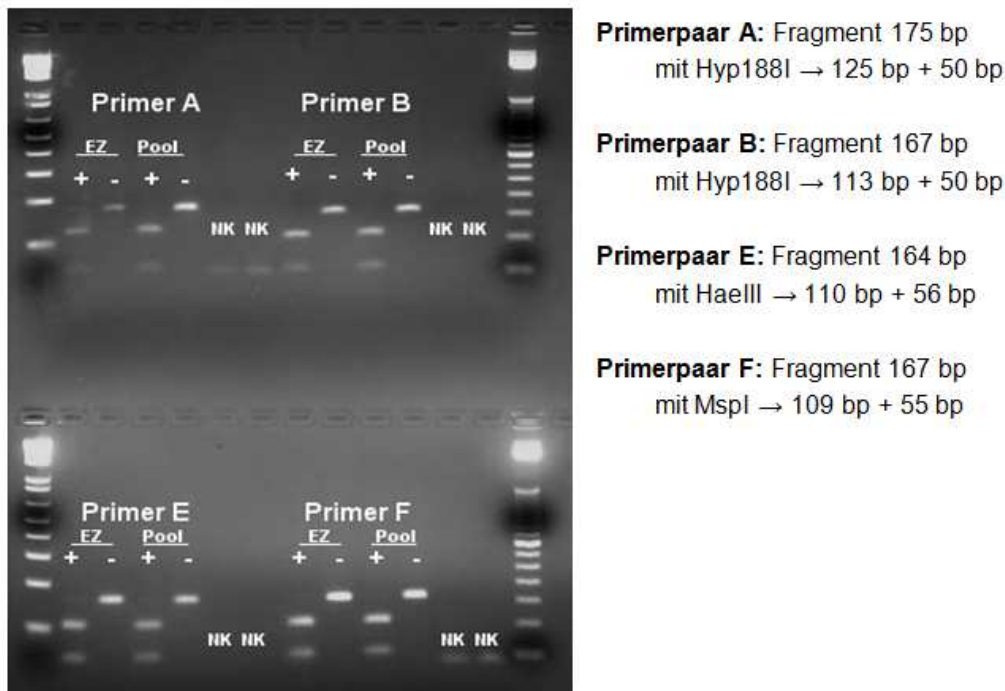
#### Primerdesign für B-RAF und N-RAS

In dieser Arbeit sollten die Mutationen der Onkogene *B-RAF* und *N-RAS* in den Patientenproben ausfindig gemacht werden. Von den Datenbanken Ensembl und NCBI wurde die gewünschte Gen-Sequenz bezogen. Mittels Vector NTI oder DNASIS wurde die Gen-Sequenz mit dem MseI Enzym virtuell geschnitten, um die in den durch die primäre PCR erhaltenden MseI Fragmente in den Proben, zu ermitteln. Dann wurden die Primer so gelegt, dass sie die zu untersuchende Mutationen einschließen und auf einem MseI Fragment liegen. Die Exon-Intron Struktur eines Gens kann mittels verschiedener Online-Datenbanken festgestellt werden. Anschließend konnte man mittels dem Primer3-Programm ([www.primer3.wi.mit.edu](http://www.primer3.wi.mit.edu); Version 4.0.0) für das jeweilige Exon (mit den bekannten Mutationen) ein spezifisches Oligonukleotid-Primerpaar erstellen. Die Primerpaare sollten folgende Eigenschaften aufweisen:

- GC-Gehalt zwischen 40-60 %
- Primer sollten 20-25 mere sein
- Resultierenden Fragmente sollten eine Länge von 50-170 bp haben
- Primer sollten keine selbst Dimerisierung und keine Haarnadelstrukturen bilden

Diese Voraussetzungen optimieren die Spezifität der Primerpaare für die zu vervielfältigende DNA-Sequenz des Genoms und verhindern somit die Bildung falscher Amplifikationsprodukte. Die so ausgewählten Primer wurden dann mittels einer Gradienten-PCR (zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur) und einem Fragment-Test (ist es das gewünschte Fragment) ausgetestet.

Für den Fragment-Test wurde nach der spezifischen PCR das Fragment mit einem Restriktionsenzym so geschnitten, dass zwei Fragmente bekannter unterschiedlicher Größe in einem Agarose-Gel sichtbar gemacht werden konnten. Dies dient zur internen Kontrolle der Sequenz mittels Gelelektrophorese und ist in **Abbildung 7** als Beispiel dargestellt. Für diesen Test wurden die Kontroll-Zellen verwendet (**Abschnitt 3.1.2.3**). Zur weiteren Kontrolle wurden diese Primerspezifität nochmals mit Hilfe des PubMeds Programmes BLAST (Nucleotide) überprüft. Erst wenn die Primerpaare diese internen Kontrollen bestanden haben, wurden sie für die weiteren Versuche verwendet.



**Abbildung 7: Beispiel eines internen Fragment-Test.**

Alle Primerpaare wurden an Einzelzellen (EZ) und Zell-Pools (Pool) von gesunden Spendern ausgetestet. Alle Primerpaare wurden mit speziellen Enzymen einmal so geschnitten, dass ein kleines Fragment um die 50 bp und ein großes Fragment größer 100 bp entsteht (s. links vom Bild). + bedeutet mit Enzym; - bedeutet kein Enzym; NK negativ Kontrolle mit Wasser; an den Außenseiten des Gels wurde ein 1 kb DNA-Ladder für die Fragmentgrößenbestimmung verwendet.

#### **B-RAF und N-RAS spezifische PCR**

Das *B-RAF* Gen liegt auf dem humanen Chromosom 7q34 (190283 bp). Die dominante *B-RAF* Mutation p.V600E (früher bekannt als p.V599E, Kumar *et al.*, 2003)<sup>3</sup> liegt im Exon 15. An dieser Stelle kommt es durch eine Punktmutation zur Aminosäureaustausch von Valin (V) zu Glutamat (E) c.1799T>A. Auch das *B-RAF* Gen wurde mit dem Restriktionsenzym *MseI* durch die Amplifikation geschnitten (insgesamt 1597-mal). Das *MseI* Fragment mit dieser Mutation ist 286 bp groß.

Das *N-RAS* Gen liegt auf dem Chromosom 1p13 und hat eine Größe von 190283 bp. Auch dieses Gen wurde wegen der Amplifikation mit dem Restriktionsenzym *MseI* geschnitten. Die häufigsten Mutationen sind im Exon 2 Codon 12 und 13 und im Exon 3 Codon 61 beschrieben. Das *MseI* Fragment für das Codon 12/13 ist 232 bp groß das Codon 61 225 bp.

Mit den selbst designten Primerpaaren (**Tabelle 2**) wurde die *B-RAF* und *N-RAS* spezifische PCR durchgeführt. So entstand für *B-RAF* ein 171 bp großes Fragment. Für *N-RAS* entstand für das Codon

<sup>3</sup> Aufgrund eines Fehlers in der NCBI Gensequenz und durch inkorrekte Experimente von mehreren früheren Studien kam p.V599E zustande (Accession Number: NM\_004333). p.V599E Mutation entspricht der p.V600E Mutation. Die Gensequenz von Kumar *et al.* (2003) und somit die Bezeichnung V600E ist dagegen korrekt und wurde im Folgenden ausschließlich verwendet (Accession Number: NT\_007914).



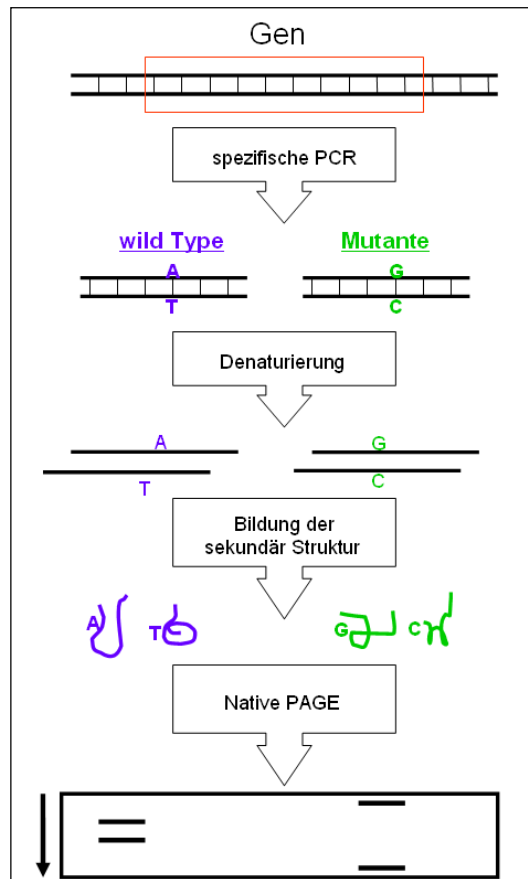
### 3. Methoden

12/13 ein 184 bp großes und für das Codon 61 ein 138 bp großes Fragment. Der Pipettieransatz war derselbe wie in **Abschnitt 3.1.4** dargestellt. Für die Versuche wurden 10 µl Ansätze und die folgenden PCR-Programm verwendet:

B-RAF	Temperatur	1 Zyklus	14 Zyklen	24 Zyklen	1 Zyklus
	94 °C	2 min	15 sec	15 sec	
	60 °C	30 sec	30 sec	30 sec	
	72 °C	2 min	20 sec	30 sec	2 min
N-RAS	Temperatur	1 Zyklus	14 Zyklen	24 Zyklen	1 Zyklus
	94 °C	2 min	15 sec	15 sec	
	63 °C	30 sec	30 sec	30 sec	
	72 °C	2 min	20 sec	30 sec	2 min

#### 3.3.2 SSCP-Analyse

Die „single strand conformation polymorphism analysis“ (SSCP) ist eine Methode zum Auffinden von Mutationen innerhalb vorgegebener Genabschnitte. Erstmals wurde sie von Ortia 1989 beschrieben. Mit Hilfe der Eigenschaften von der SSCP-Methode kann man sowohl SNPs, als auch kleinere Insertionen und Deletionen nachweisen. Dabei werden die Segmente eines Gens mittels PCR amplifiziert und bei 95 °C denaturiert. Die so gewonnenen DNA-Einzelstränge (ssDNA) werden auf einem nativen 15 % Polyacrylamid-Gel (native PAGE) elektrophoretisch aufgetrennt. Das Laufverhalten der einzelsträngigen DNA ist dabei von der Basensequenz abhängig, so dass einzelsträngige DNA-Moleküle unterschiedlicher Sequenz unterschiedliche Konformationen einnehmen. Diese Auftrennung erfolgt daher nicht nach Länge sondern nach räumlicher Anordnung, da ssDNA-Moleküle unterschiedlicher Sequenz unterschiedliche Konformationen (Sekundärstrukturen) haben und daher mal schneller bzw. mal langsamer laufen. Ein ssDNA-Molekül kann zudem mehrere räumliche Strukturen einnehmen, so dass mehrere Banden im Gel derselben Sequenz entsprechen können. Wenn ein Polymorphismus vorliegt, der die räumliche Struktur des DNA-Stranges verändert, wandert das Molekül im Gel mit veränderter Geschwindigkeit und bildet einen „Bandenshift“, es zeigt sich ein anderes Bandenmuster als in der Wildtyp-Sequenz (**Abbildung 8**). Die SSCP Methode wurde gewählt, weil sie ein schnelles, kostengünstiges Mutations-Screening Verfahren darstellt und die Proben direkt vergleichbar sind.



**Abbildung 8: Darstellung der SSCP-Analyse**

Eine Ziel-Sequenz wird mittels einer spezifischer PCR amplifiziert, denaturiert (ssDNA) und auf einem nicht denaturierenden nativen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Das Laufverhalten der ssDNA ist dabei von der Basensequenz abhängig, so dass ssDNA-Moleküle unterschiedlicher Sequenz unterschiedliche Konformationen einnehmen. Auf diese Weise führen Mutationen zu einer Konformationsänderung und weisen dann ein verändertes Laufverhalten im Gel auf.

#### 3.3.3 Gelelektrophorese und Validierung der SSCP

Die Sensitivität der Methode ist von mehreren Faktoren abhängig, weshalb die Angaben in der Literatur stark variieren. Daher sollte in dieser Arbeit eine Optimierung der Methode für die Gene B-Raf und N-Ras durchgeführt werden. Die Faktoren, die die SSCP beeinflussen und das Laufverhalten der ssDNA verändern können sind vor allem die Länge der analysierten DNA-Fragmente, die Lauf-Temperatur, der pH-Wert und die Gel-Konzentration. Daher sollten die PCR-Produkte von B-Raf und N-Ras nicht zu lang gewählt werden (für eine Basenlänge von 100-300 bp wurde die größte Sensitivität erreicht). Für DNA-Fragmente > 300 bp sollte durch Zugabe von Glycerol (pH-Wert im Puffer erniedrigen) die Sensitivität gesteigert werden. Für die SSCP wurde ein 15 %iges Polyacrylamidgel (PAA) verwendet, mit oder ohne Glycerol:

### 3. Methoden

15% PAA (100 ml)	
Reagenzien	Volumen
10x TBE	15 ml
Acryl Amid (29:1) Neurotoxin!	50 ml
H <sub>2</sub> O	35 ml

Lichtempfindlich; Lagerung bei 4°C

Zu 50 ml der PAA-Lösung wurde mit 400 µl APS (Amoniumpersulfat) und 100 µl TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin) für die Polymerisation gemischt und das Gel zwischen zwei sauberen Glasplatten gegossen. Das feste PAA-Gel wird horizontal in eine Gel-Vorrichtung eingespannt und mit Vaseline abgedichtet. Als Kammerpuffer wurde kaltes 1,5x TBE verwendet. 10 µl von der spezifischen PCR wurden 1:1 mit dem folgendem Auftragspuffer gemischt und für 5 min bei 95 °C denaturiert.

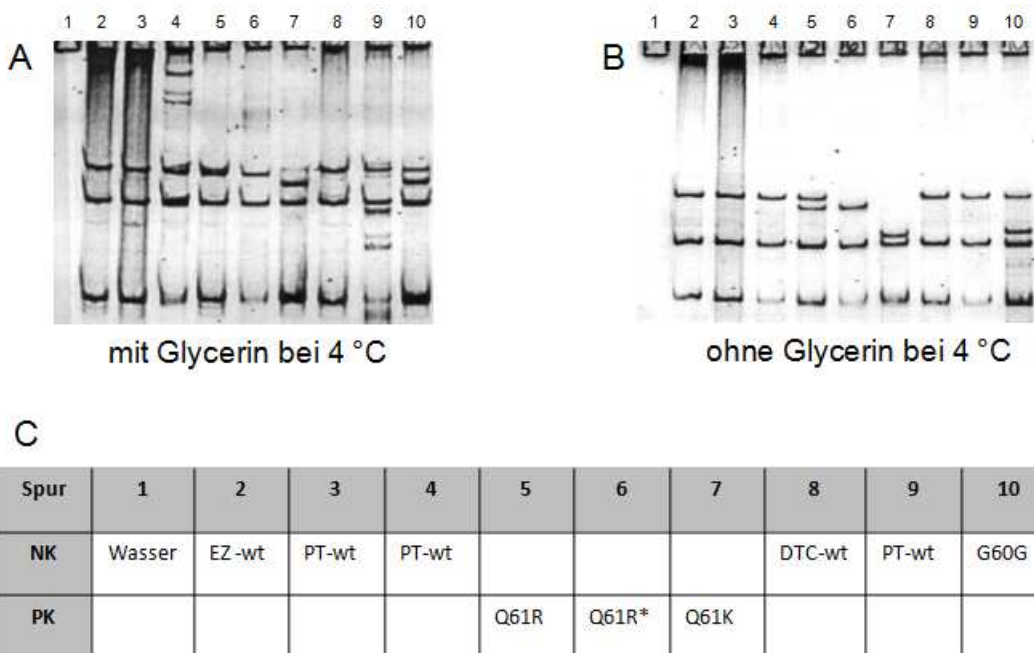
Auftragspuffer	
Reagenzien	Volumen
Formamid	5 ml
Bromphenolblau 1%-Stammlsg.	250 µl
0,2 M EDTA	250 µl

Lagerung bei RT

Danach kamen die Proben sofort auf Eis, damit die DNA einzelsträngig bleibt. Die 20 µl wurden dann aufs Gel aufgetragen. Die Laufzeiten hängen von der zu untersuchenden Sequenz ab. Nach Ende der Laufzeit wurde das Gel vorsichtig von einer Glasplatten gelöst. Die verbleibende Glasplatte wurde mit 70 %igem Ethanol und mit Kimwibe-Tüchern von unten gesäubert. 3 µl SYBR-Gold (oder Ethidiumbromid) wurde in 25 ml 1,5x TBE verdünnt und übers Gel gegossen. Die Inkubierung erfolgte für 5 min im Dunkeln. Danach wurde das Gel mit 1,5x TBE gewaschen und mittels eines Scanners fotografiert und dokumentiert.

In **Abbildung 9** ist ein Validierungsbeispiel von N-RAS Codon 61 aufgeführt. Das SSCP-Gel mit Glycerin zeigte im Gegensatz zu dem Gel ohne Glycerin ein schlechteres Bandenmuster. Demnach wurden alle PAA-Gele ohne Glycerin verwendet.

Für die SSCP der Onkogene B-RAF und N-RAS konnten spezifische Faktoren, die für eine hohe Sensitivität und Laufverhalten stehen, ermittelt werden und sind im Ergebnisteil **Abschnitt 4.3.1** aufgeführt.



**Abbildung 9: Validierungsbeispiel der SSCP-Gelelektrophorese von N-RAS Codon 61.**

**A:** 15 %-PAA-Gel mit Glycerin, bei 4° C, 300 V für 8 Stunden. **B:** 15 %-PAA-Gel ohne Glycerin, bei 4° C, 300 V für 8 Stunden. **C:** Übersicht der verwendeten Kontroll-Proben. EZ=Kontroll-Einzelzelle; PT=Primärtumorprobe; DTC=disseminierte Tumoreinzelzelle; wt=wildtyp.

### Kontrollen

Durch die räumliche Auftrennung der ssDNA kann eine Mutation durch einen „Bandenshift“ sichtbar gemacht werden, dies bedeutet eine Änderung in der räumlichen Struktur des DNA-Stranges. Als Vergleich dienten Kontroll-Einzelzellen und Kontroll-Zellpools mit bekannter Wildtyp-Sequenz. Bei einem „Bandenshift“ wurden die auffälligen Proben anschließend zur Kontrolle zusätzlich sequenziert. In **Tabelle 3** sind die Kontrollen für die Gelelektrophorese aufgelistet, die bei jedem Gel mitgelaufen waren.

**Tabelle 3: Positiv- und negativ-Kontrollen für die SSCP-Gelelektrophorese bekannter Sequenz.**

Negativ Kontrollen	B-RAF	N-RAS
Lymphozyten-Einzelzellen	wildtyp	wildtyp
Lymphozyten-Pool	wildtyp	wildtyp
10PT01	wildtyp	wildtyp + p.G60G
19PT03	wildtyp	wildtyp + p.G60G
01PT01	wildtyp	wildtyp
Positiv Kontrollen	B-RAF	N-RAS
15PT01	V600E (het)	wildtyp + p.G60G
03PT01	wildtyp	Q61R
11PT01	V600E (het)	Q61R*
06PT01	wildtyp	Q61K

#### 3.4 DNA-Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese

Die in der SSCP-Analyse gefundenen Proben mit einem „Bandenshift“ wurden zur Kontrolle auf Sequenzebene identifiziert. Dazu wurde die heute gängigste Methode der Kettenabbruch-Synthese (bzw. Didesoxymethode) nach Sanger verwendet (Sanger *et al.*, 1992). Bei dieser Methode wird der mit Fluoreszenzfarbstoffen markierter komplementärer DNA-Strang in vitro synthetisiert, wobei die Verwendung Didesoxynucleotide zu einem zufallsmäßigen Kettenabbruch und somit zu unterschiedlich langen DNA-Strängen führt.

##### Spezifische PCR

Als erstes wurde von der zu untersuchenden Probe eine spezifische PCR 4-facher Ansatz hergestellt: 38 µl Mastermix und 2 µl Probe.

##### Aufreinigung der Proben

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurden Promega DNA-Säulen verwendet. Dazu wurde das Protokoll von Promega verwendet und die Probe in 30 µl dH<sub>2</sub>O eluiert (ca. 25 µl Endvolumen).

##### Gelelektrophoretische Überprüfung der PCR-Produkte

Die gereinigten PCR-Produkte wurden auf ein 2,5 %iges EtBr-Agarose Gel zur Kontrolle der PCR und Aufreinigung aufgetragen (5 µl vom PCR-Produkt mit 3 µl Orange-Dye) und bei 110 V/400 mA 25 min laufen gelassen. Nur Proben mit einer sauberen Bande wurden weiter verwendet.

##### PEG-Fällung

Für das Sequenzieren müssen die Proben sehr sauber sein. Mittels der PEG-Fällung nach Rosentahl *et al.* (1993) werden die PCR-Primer aus den PCR-Ansätzen herausgelöst. Dazu wurden die verbleibenden 20 µl mit 20 µl PEG-Mix gevortext und 20 Minuten bei RT inkubiert:

Reagenzien PEG-Mix	Volumen
PEG 8000	13,1 g
3M NaAC pH 5.2	10 mL
1M MgCl <sub>2</sub> -Lösung	330 µl
auf 50 mL mit Aqua dest. auffüllen	

Nach einer Zentrifugation (25 min; bei 13.000 rpm) wurde der Überstand sofort abgezogen. Zum Pellet wurde 100 µl Ethanol (100 % unvergällt) zugeben und 2-mal vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand sorgfältig abgezogen. Das Pellet wird bei RT getrocknet. Danach wird das PEG-DNA-Pellet in 12 µl destilliertem Wasser eluiert und für 10 min bei 37 °C im Thermomixer inkubiert.

### 3. Methoden

#### DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Qualität und Menge der PEG-DNA wurde anhand eines 3 % EtBr-Agarose-Gels festgestellt (2 µl PEG-DNA + 2 µl Dye + 3 µl H<sub>2</sub>O). Das Gel lief bei 110 V/400 mA für 40 min. Wenn die Probe eine „fette“ Bande aufwies, wurde davon ausgegangen, dass die Konzentration 100 ng beträgt. Für die Sequenzreaktion wurde dann 1 µl eingesetzt.

#### Sequenzreaktion

Als Ausgangspunkt der Neusynthese dienten die sequenzspezifischen Primer der Onkogene *B-RAF* und *N-RAS*, die an die einzelsträngige Matrize anbinden. Anders als bei der PCR wurde nur ein Primer eingesetzt, so dass die DNA nur linear amplifiziert wird. Die DNA-Polymerase synthetisiert in vier parallelen Reaktionen die Synthese des komplementären Stranges, wobei neben den vier 2-Desoxyribonucleotridtriphosphaten (dNTP: dATP, dTTP, dCTP und dGTP) jeweils ein Didesoxytriphosphat (ddNTP: ddATP, ddTTP, ddCTP und ddGTP) zugefügt wurde. Dieses wurde wie die anderen eingebaut, allerdings kann die Kettenverlängerung aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxygruppe nicht erfolgen. Auf diese Weise erhielt man ein Gemisch mit unterschiedlich langen DNA-Molekülen, an deren 3'-Ende sich stets eine bestimmte Base befand. Jedes der verwendeten ddNTPs besitzt einen unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoff. Für die Sequenzreaktion wurde als erstes der sogenannte Premix hergestellt:

Reagenzien Premix	Volumen
Big Dye Terminator	2 µl
5x Sequenz-Buffer	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	3 µl
Endvolumen	8 µl

Die Zugabe von dem 5x Sequenz-Buffer richtet sich nach der zu sequenzierenden Fragmentlänge. Für Fragmente ≤ 200 bp (wie *B-RAF* 171 bp und *N-RAS* 184 bp und 138 bp) - wurde insgesamt 8 µl pro Probe vom Premix zugeben. Dabei war es wichtig, dass man den Big Dye Terminator vor Gebrauch vorsichtig schwenkt, da die schweren Guanine (G) sich gerne am Boden ablagern. Durch die lichtempfindlichen Fluorezenzfarbstoffe wurden die Proben nur kurz dem Licht ausgesetzt, ansonsten wurden sie immer abgedeckt. Zu dem Premix kamen dann die fehlenden Reagenzien des Sequenzierungsansatz hinzu:

Reagenzien Sequenzierungsansatz	Volumen
Premix	8 µl
3'-Primer (oder 5'-Primer) 3,2 µM	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	9 µl
PEG-DNA	1 µl
Endvolumen	20 µl

### 3. Methoden

---

Für die Sequenzierungsreaktion wurde folgendes Programm verwendet:

Temperatur	25 Zyklen
96°C	15sec Denaturierung
50°C oder 55°C *	15sec Annealing
60°C	4 min Extension
4°C	∞

\* Die Temperatur richtet sich nach dem GC-Gehalt der verwendeten Primer: GC < 50 = 50 °C für B-RAF und GC = 50 = 55 °C für N-RAS61 und N-RAS12/13

#### **Ethanol-Fällung**

Nach der Sequenzierungsreaktion wurde zur Säuberung des Produkts die Ethanol-Fällung verwendet. Dazu wurden in 1,5 ml Cups 80 µl destilliertes Wasser pipettiert. Hinzu kamen 10 µl NaAC (3 M, pH 4,6), 250 µl 100 % EtOH (unvergällt) und die 20 µl des Sequenzierungsansatzes. Dieses Gemisch wurde vorsichtig gemischt und dann bei RT für 10 min im Dunkeln stehen gelassen. Danach folgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm (Cups immer in gleicher Richtung einsetzen – Pellet zu klein um es zu sehen!). Der Überstand wurde abgekippt und der Rand des Cups auf ein Kleenex abgedrückt. Das Pellet wurde mit 250 µl 70 % EtOH (unvergällt) gewaschen und 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette sorgfältig abgezogen und das Cup bei RT im Dunkeln getrocknet. Falls keine direkte Weiterverarbeitung folgte, wurde die Probe bei -20 °C eingefroren.

#### **Vorbereitung für den Sequenzer ABI 3100**

Das getrocknete Pellet wurde in 15 µl Hi-Di Formamide resuspendiert und kurz bei RT stehen gelassen. Dann wurde die Probe gevortext und die gesamte Probe wurde in die ABI-Reaktionsplatte des ABI 3100 Sequenzer luftblasenfrei pipettiert. Die entstandenen Kettenabbruchprodukte wurden mittels der Kapillarelektrophorese aufgetrennt und die Fluoreszenz mit Hilfe eines Lasers angeregt. Die ddNTPs am Ende jedes DNA-Fragmentes zeigten dadurch Fluoreszenz unterschiedlicher Farbe und konnten von dem Detektor des Sequenzers erkannt werden.

#### **Auswertung der Sequenzen**

Mit Hilfe der Software SeqA wurden aus den Fluoreszenz-Peaks eine DNA Sequenz für die jeweilige Probe erstellt. Das so entstandene Chromatogramm (die Abfolge der Fluoreszenzsignale A, T, C und G) gab direkt die Sequenz des sequenzierten DNA-Stranges wieder. Mit dem Programm Chromas (Freie Version: chromaslite200) liesen sich diese durch die Sequenzierung erhaltenen Sequenzen am Computer auswerten. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Hintergrund-Signale sehr gering waren und der Abstand der einzelnen Peaks gleichmäßig war, um richtige Ergebnisse zu liefern. Um dies zu erhalten wurde bei der PCR und bei der Aufreinigung sauber gearbeitet.

### 3. Methoden

Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden mit den Wildtyp Sequenzen von *B-RAF* und *N-RAS* abgeglichen (z.B. mittels PubMed Blast). So konnten auch homozygote Mutationen sicher erkannt werden. Waren Veränderungen der DNA Sequenz nur auf einem Allel detektierbar, dies entsprach einer heterozygote Mutation, so erschien in der Sequenz ein Doppel-Peak zweier verschiedener Fluorophore an der gleichen Stelle (sog. Mischbasen). Die Sequenz Symbole und die Mischbasen haben eine eigene „Buchstaben Nomenklatur“ die in **Tabelle 4** und **Tabelle 5** aufgeführt ist. Manchmal ging allerdings nur das Signal des größeren Peaks in die Sequenz ein. Heterozygote Mutationen wurden daher oft nur durch die Kontrolle der Chromatogramme mit den Peaks visuell erkannt. Um eine solche Fehlerquelle zu vermeiden, war es daher unverzichtbar alle Chromatogramme und deren resultierende DNA Sequenz genau zu kontrollieren, aber auch sehr zeitaufwendig.

**Tabelle 4:**      *Sequenz Symbole*

Symbol	entspricht
A	Adenin
T	Thymin
C	Cytosin
G	Guanin
I	Inosin
U	Uracil

**Tabelle 5:**      *Wobble IUPAC-IUB Symbole*

Symbol	entspricht
R	A oder G
Y	C oder T
M	A oder C
K	G oder T
S	G oder C
W	A oder T
H	A oder C oder T
B	G oder T oder C
V	G oder C oder A
D	G oder T oder A
N	G oder A oder T oder C

### 3.5 Quantifizierung von DNA

Mit der quantitativen PCR (qPCR), auch Real-Time-PCR genannt, lässt sich die Ausgangskonzentration einer spezifischen DNA-Sequenz in einer Probe in „Echtzeit“, d.h. während des Amplifikationsprozesses, detektieren. Der große Vorteil der Methode der quantitativen PCR liegt in der großen Sensitivität, die durch die exponentielle Amplifikation der Zielsequenz vor der Quantifizierung erreicht werden kann.



#### Zielgen und Referenzgene

Durch die CGH-Analyse wurde ein abweichender Chromosomenbereich zwischen den DTC und den PT des MAPK-Signaltransduktionsweg mittels einer qPCR genauer untersucht. Daraus resultierte das Zielgen Cyclin D1 (CCND1). Als Referenzgene wurden die der Arbeitsgruppe Klein AGTR1, BlueCone P, CACNA1D, GZMB, RUFY2 und SMYD1 verwendet und in **Tabelle 6** und **Tabelle 7** aufgelistet. Die dazugehörigen Primerpaare sind in **Tabelle 2 im Abschnitt 2.1** aufgelistet.

Die qPCR erfolgte entsprechend der normalen PCR, wobei nach jedem abgeschlossenen Zyklus die DNA Menge gemessen wurde. Durch die Zugabe eines fluoreszierenden Farbstoffs (SYBR Green) in die PCR-Reaktion, konnte die DNA-Menge bestimmt werden. SYBR Green ist ein Farbstoff, der ungebunden so gut wie keine Fluoreszenz abgibt. Bindet er jedoch an dsDNA, fluoresziert er bis zu 1000 fach stärker. Die Intensität der Fluoreszenz wurde nun nach jedem Zyklus gemessen und über die Zyklusanzahl aufgetragen. Der Kurvenverlauf lässt sich in zwei Phasen einteilen: Eine exponentielle und eine nicht-exponentielle Phase. Während der exponentiellen Phase verdoppelt sich die Menge an DNA in jedem Zyklus. Experimentell wurden für eine optimierte PCR Effizienz-Werte von 0,8 bis 0,9 gefunden (Zorbas, 1999). Jedoch fällt die Effizienz der PCR mit steigender Zykluszahl stark ab, da u.a. die Komponenten des Reaktionsansatzes verbraucht werden und die Polymeraseaktivität abnimmt. Die Reaktion wird langsamer und erreicht ein Plateau- die nicht-exponentielle Phase. Am Anfang ist die eigentliche Fluoreszenz nicht von der Hintergrundfluoreszenz des Farbstoffs zu unterscheiden. Im Verlauf der Reaktion nimmt die Intensität jedoch zu und es wird ein Schwellenwert manuell festgelegt, ab dem von Fluoreszenz gesprochen wird. Der dazugehörige Zykluswert wird als  $C_q$ -Wert bezeichnet (quantification cycle). In der Praxis ist die Effizienz der PCR-Reaktion jedoch nicht immer optimal. In der real-time PCR wird heute nicht mehr primär in DNA-Produktmengen oder Konzentrationen gerechnet, sondern als Maß für die Quantifizierung der Startmenge werden die sog.  $C_p$  (= Crossing Point) Werte herangezogen. Sie entsprechen der Anzahl der PCR Zyklen, die nötig sind um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Am  $C_p$  befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA.

**Tabelle 6:**      *Referenzgene für die qPCR*

Gene	Lokalisation	Ensembl-ID	HGNC-ID	Primer-ID
AGTR1	3q24	ENSG00000144891	336	ATGR (283)
BCP	7q31.3-q32	ENSG00000128617	1012	BlueCone (288)
CACNA1D	3p14.3	ENSG00000157388	1391	CACNA (223)
GZMB	14q11.2	ENSG00000100453	4709	Granzym B (336)
RUFY2	10q22.2	ENSG00000204130	19761	RUFY2 (458)
SMYD1	2p11.1	ENSG00000115593	20986	SMYD1 (287)

**Tabelle 7: Verwendete Annealingtemperatur und die Fragmentgröße der Referenzgene**

Gene	Lokalisation	Primer-ID	Fragmentgröße	Tm
AGTR1	3q24	ATGR (283)	105 bp	
BCP	7q31.3-q32	BlueCone (288)	77 bp	
CACNA1D	3p14.3	CACNA (223)	91 bp	
GZMB	14q11.2	Granzym B (336)	184 bp	
RUFY2	10q22.2	RUFY2 (458)	104 bp	64 °C
SMYD1	2p11.1	SMYD1 (287)	163 bp	

#### Primerauswahl

Folgende Primerpaare wurden benötigt:

- 1 Zielgen (CCND1) mit je 3 Primerpaaren
- 6 Referenzgene mit je 1 Primerpaar pro Gen

Die Primer für den qPCR Ansatz wurden jeweils so geplant, dass sie in den allgemeinen Eigenschaften übereinstimmen (s. Abschnitt Primerdesign). Dies ermöglichte es, dass alle PCR-Reaktionen in einem PCR-Gerät gleichzeitig verwendet wurden. Durch die unterschiedliche Annealingtemperatur wurden mehrere Platten verwendet.

- Annealing Temperatur von 55-66 °C
- GC-Gehalt sollte zwischen 40-60 % liegen
- Primer sollten im Bereich von 20-25 mere liegen
- Die resultierenden Fragmente sollten eine Länge von 50-185 bp haben
- Primer sollten keine selbst Dimerisierung machen und keine Haarnadelstrukturen bilden

Für das Cyclin D 1 Gen wurden 6 Primerpaare designt. Die ausgewählten Primer wurden mittels der Gradienten-PCR und des Fragment-Testes (**Abschnitt 3.3.1**) ausgetestet. Drei Primerpaare wurden danach für die qPCR ausgewählt, die bei der gemeinsamen Annealingtemperatur von 62 °C liefen:

CCND1	Fragmentgröße	Tm
Primerpaar C	98 bp	62 °C
Primerpaar D	81 bp	62 °C
Primerpaar F	164 bp	62 °C

#### 3.5.1 qPCR Durchführung

##### Standardkurven und Primereffizienzen

Die Standardkurven wurden mit gepoolten Kontroll-Einzelzellen (KZ; interne Standard-Kontrollzellen der AG Klein s. **Abschnitt 3.1.2.3**), die mittels der primären PCR (MSE) amplifiziert wurden, durchgeführt. Ein Referenzstandard bekannter Konzentration wurde in mehreren Stufen verdünnt, amplifiziert und die Konzentration bestimmt, die bei einem vorgegebenen PCR-Protokoll gerade noch

### 3. Methoden

ein nachweisbares Amplifikat ergab. Eine zu quantifizierende Probe wurde nun ebenfalls in mehreren Schritten verdünnt, um eben diesen Punkt zu ermitteln. Die Anzahl der Verdünnungen lässt dann auf die Ausgangskonzentration der Probe schließen. Die Verdünnungsreihe der Standardkurven wurde in Triplikaten vollzogen und nach folgendem Verdünnungsschema pipettiert:

Verdünnungsschema	1	2	3
A	980 µl Wasser+ 20 µl KZ	500 µl überpipettieren	1:50
B	500 µl	500 µl überpipettieren	1:100
C	500 µl	500 µl überpipettieren	1:200
D	500 µl	500 µl überpipettieren	1:400
E	500 µl	500 µl überpipettieren	1:800
F	500 µl	500 µl überpipettieren	1:1600
G	500 µl	500 µl überpipettieren	1:32000
H	500 µl	-	leer

#### Externe Standardkurve

Die qPCR ist eine Methode, um die DNA-Kopienanzahl zu bestimmen. Dazu wurde der  $C_q$ -Wert der unbekannten Probe mit den  $C_q$ -Werten einer Standardkurve verglichen. Dafür wurde eine Standardkurve mit einer Probe bekannter Konzentration und seriellen Verdünnungsschritten erstellt. Die Probe sollte der späteren Zielsequenz relativ ähnlich sein und mit den gleichen Primern amplifiziert werden. Die Messung des Signals musste eine quantitative Aussage zulassen. Nach Amplifikation der Probe mit bekannter Konzentration überträgt man deren Signal in die Standardkurve und konnte so direkt die Ausgangskonzentration ablesen.

- Die Geradengleichung lautet:  $C_q = m(\log \text{Quantität}) + b$

#### 3.5.3.1 qPCR der DTC-Proben

##### Limitierende Verdünnung

Da die Quantifizierung von der eingesetzten DNA-Konzentration und dem  $C_q$ -Wert abhängt, war es zwingend notwendig, dass die qPCR unter optimalen Bedingungen verläuft. Dafür mussten folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

- Eine lineare Standardkurve ( $R^2 > 0,980$  oder  $r > 1-0,0990$ )
- Hohe Amplifikationseffizienz (mehr als 90 %)
- Konsistenz innerhalb der Wiederholungen

Um dies zu gewährleisten war es notwendig, dass eine Verdünnungsreihe der Probe angesetzt wurde. Die daraus entstandene Kurve ist die Standardkurve und wurde mit Proben einer bekannten DNA-Konzentration durchgeführt. Idealerweise verlaufen die Triplikate der Messungen identisch und die Abstände zwischen den  $C_q$ -Werten der einzelnen Verdünnungsschritte waren demnach gleichbleibend.

### 3. Methoden

---

Dazu wurden die DTC-Proben (primäres PCR Produkt) mit PCR-Wasser verdünnt. Dann wurden jeweils 297 µl PCR-Wasser vorpipettiert und anschließend 3 µl der DTC-Probe in das PCR-Wasser hinein pipettiert und vermischt (Proben-Verdünnungsplatte). Anschließend wurden 90 µl dieser Verdünnung in eine BackUp-Platte überführt. Diese BackUp-Platte wurde sofort bei -20 °C weggefroren.

Das primäre PCR-Produkt der DTC diente als Template für die qPCR. Um Pipettierfehler so gering wie möglich zu halten, wurden Mastermixe erstellt. 14 µl Mastermix per Well (ROCHE SYBR Green Master 906 µl + 96 µl Primer 3' + 96 µl Primer 5' + 297 µl PCR-Wasser) wurde in eine ROCHE 96-Well-Platte vor pipettiert (Test-Platte). In diese Test-Platte wurde dann die Reihe 1 der Proben-Verdünnungsplatte in Reihe 1 und in Reihe 7 (jeweils 5 µl; Duplikate), Reihe 2 in Reihe 2 und Reihe 8 usw. pipettiert. Als negativ Kontrolle (NK) wurde 5 µl ddH<sub>2</sub>O verwendet. Bei der Austestung des Standards (1:100) wurde auch 5 µl verwendet. Zum Schluss wurde die Test-Platte mit Folien verklebt, bei 1000 g für 2 min abzentrifugiert und in den LightCycler gestellt. Das für den Primer entsprechende Programm mit der spezifischen Annealingtemperatur mit 38 Zyklen plus einer Schmelzkurve wurde ausgewählt und gestartet.

#### 3.5.3.2 qPCR Auswertung

##### Schmelzkurve

Um sicher zu gehen, dass nur das gewünschte PCR-Produkt amplifiziert wurde und keine anderen PCR-Produkte oder Primer Dimere, kann an die qPCR eine Schmelzkurve angeschlossen werden. Dabei wurde die Temperatur kontinuierlich erhöht und dabei die Fluoreszenzintensität gemessen. Da SYBR Green I nur an dsDNA bindet und bei steigender Temperatur die dsDNA einzelsträngig wird, nimmt die Fluoreszenzintensität mit zunehmender Temperatur ab. Dabei ist  $T_m$  die Temperatur, bei der 50 % der DNA denaturiert vorliegt. Der  $T_m$ -Wert ist für jedes PCR-Produkt spezifisch.

Am Ende aller Läufe wurde mittels der ROCHE-LightCycler480-Software die Schmelzkurve berechnet um sicher zu stellen, dass das richtige Fragment amplifiziert wurde. Zeigte eine Probe in einer Vertiefung, oder in beiden keine der Primer entsprechenden Schmelzkurve, kann dieser Primer nicht für die Auswertung verwendet werden. Ist die negativ Kontrolle positiv, oder zeigt der Standard keine Amplifikation, muss die gesamte Platte wiederholt werden. Proben, die ausfallen wurden markiert und später manuell gelöscht bzw. mit NA gekennzeichnet. Auch bei einem zu hohen Cp-Wert (ab 30), wurde diese Probe mit NA gekennzeichnet. Sind mehr als 2 Referenzgene und mehr als ein Targetgen einer Probe mit NA gekennzeichnet, konnte diese Probe nicht ausgewertet werden.

#### **Relative Quantifizierung - Normalisierung mittels Referenzgene**

Bei der relativen Quantifizierung wurde die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres nicht reguliertes „Housekeeping Gen“ (HKG) bzw. Referenzgene oder auf einen HKG Index, der sich aus mehreren HKG zusammensetzt, bezogen. Man nennt diesen Vorgang auch Normalisierung der Expressionsergebnisse. Hier wurden 6 Referenzgene aus der AG Klein ermittelt und zur Normalisierung eingesetzt.

Vergleich des Targetgens Cyclin D1 mit den Referenzgenen unter Verwendung der Primereffizienz und des Standards (normalisierte Werte). Pro Probe ergaben sich hier 18 normalisierte Werte (3 Primer gegen 6 Referenzgene).

#### **Amplifikationswahrscheinlichkeit**

Die zuvor erstellten normalisierten Werte wurden mittels der ROCHE-LightCycler480-Software Program R mit den Kontroll-Zellen, die ebenfalls das gleiche Protokoll durchliefen, zu den Amplifikations-Wahrscheinlichkeiten umgerechnet.

Bei internen Tests von Zelllinien in der AG Klein, bei denen eine Amplifikation mittels FISH nachgewiesen wurde und diese Zellen dann mit der qPCR untersucht wurden, wurde ein Grenzwert von 0,95 festgelegt. Lag das Ergebniss des Zielgens der qPCR über 0,95 wurde es als positiv gewertet.

#### **Eichgerade**

Unter optimalen Bedingungen wurde bei der PCR mit jedem Zyklus die Anzahl der zu amplifizierenden DNA-Sequenz verdoppelt, dann wird der Abstand zwischen den Fluoreszenzkurven durch die Gleichung  $2^n = \text{Verdünnungsfaktor}$  ausgedrückt, wobei n die Anzahl der Zyklen zwischen den Kurven am Schwellenwert (bzw. Unterschied zwischen den  $C_q$ -Werten der Kurven) war. Die daraus gewonnenen  $C_q$ -Werte gegen den Logarithmus der DNA-Konzentration aufgetragen, erhält man die Eichgerade. Anhand der Eichgeradengleichung und Pearson's correlation coefficient (r) oder dem Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ), kann eine Aussage getroffen werden, wie gut die experimentellen Daten mit der Eichgerade übereinstimmen (wie linear die Daten sind). Linearität ist ein Maß für die Variabilität zwischen Replikaten und ob die Amplifizierungseffizienz gleich ist für die Proben mit verschiedenen DNA-Ausgangskonzentrationen. Eine signifikante Differenz in den  $C_q$ -Werten zwischen den Replikaten wird die r oder  $R^2$  Werte verringern. Bei einer quantitativen PCR ist daher zu beachten, dass die Effizienzen von zu vergleichenden PCR-Reaktionen in etwa gleich sind und Werte aus dem log-linearen Bereich der exponentiellen Amplikonbildungskurve verwendet werden. Idealerweise sollte die Effizienz 100 % betragen. Jedoch wird die Effizienz in der Praxis durch schlechtes Primerdesign (Primer Dimere), Pipettierfehler oder durch suboptimale Reaktionsbedingungen verringert.

## 3.6 Statistische Berechnungen

Die in dieser Arbeit durchgeführten statistischen Testverfahren wurden mit Programmen durchgeführt, die im Internet kostenfrei zur Verfügung standen (Internetlink: <http://vassarstats.net/> Stand 2014).

Der p-Wert (Signifikanzwert) kann auf verschiedene Weise berechnet werden. Er wurde in dieser Arbeit immer als p=two-tailed Ergebnis angegeben. Ein p-Wert  $p < 0.05$  wurde als signifikant angenommen.

### 3.6.1 Exakter Test

Der Exakte Test nach Fisher (Fishers Exakt Test, exakter Chi-Quadrat-Test) ist ein Signifikanztest auf Unabhängigkeit in der Kontingenztafel, welcher auch bei einer geringen Anzahl von Beobachtungen zuverlässige Resultate liefert. Im Anwendungsgebiet entspricht er dem Chi-Quadrat-Test. Der p-Wert wurde immer two-tailed angegeben.

### 3.6.2 Nicht-parametrische Tests

Hier wird der p-Wert (Signifikanzwert) mit parameterfreien Tests der Typ der Zufallsverteilung (auch nichtparametrische Tests oder Verteilungstests genannt) überprüft. In dieser Arbeit wurden folgende parameterfreien Tests verwendet:

- Der Mann-Whitney-U-Test vergleicht die Lage zweier unabhängiger Stichproben.
- Der Kruskal-Wallis-Test vergleicht die Lage von drei oder mehr Gruppen unabhängiger Stichproben.

#### Mann-Whitney-U-Test

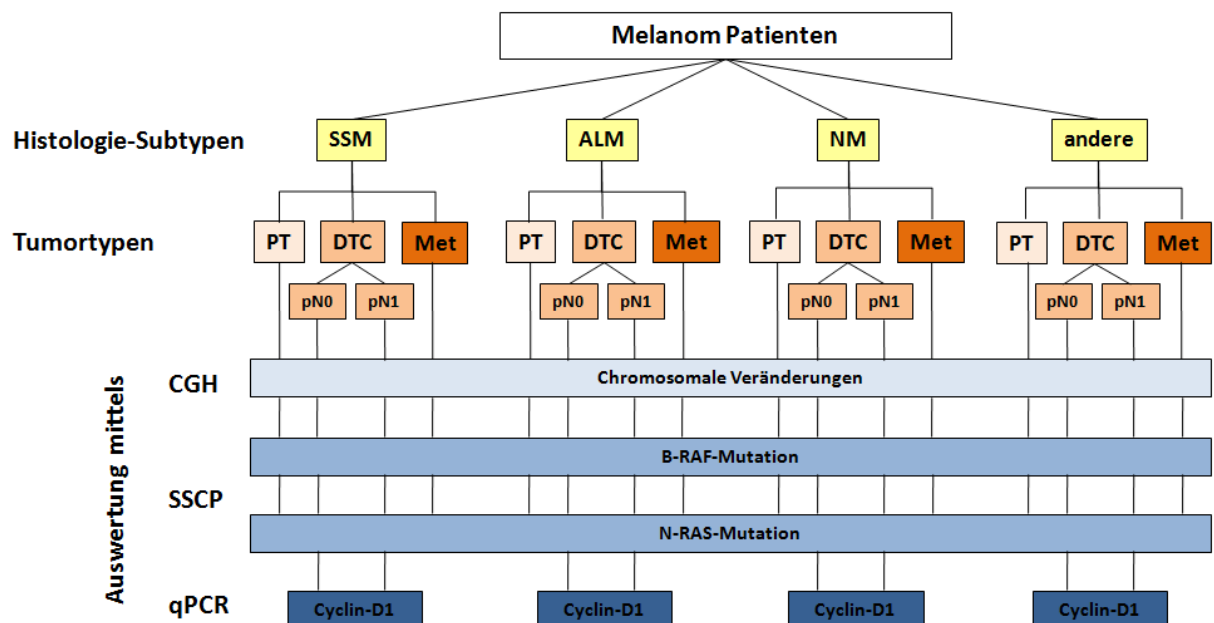
Der Mann-Whitney-U-Test (auch „Wilcoxon-Mann-Whitney-Test“ genannt) ist ein parameterfreier statistischer Test; ein sog. Rangsummentest. Die Berechnung der Teststatistik basiert auf dem Vergleich von zwei Rangreihen. Er wurde angewendet, um Mittelwert-Unterschiede zwischen einer Experimental- und einer Kontrollgruppe zu untersuchen.

#### Kruskal-Wallis-Test

Der Kruskal-Wallis-Test (auch H-Test genannt) ist ein erweiterter Mann-Whitney-Test zur Überprüfung, ob sich die zentralen Tendenzen von mehr als zwei verschiedenen Stichproben signifikant voneinander unterscheiden. Mit diesem Test wurden Mittelwert-Unterschiede zwischen Experimentalgruppen oder mehrere Experimental- und einer oder mehr Kontrollgruppen zu untersuchen.

## 4. Ergebnisse

Ziel der Arbeit war die Identifizierung wichtiger Genomveränderungen, die für die Entstehung und die systemische Progression des malignen Melanoms verantwortlich sein könnten. Dazu wurden aus den Histologie-Subtypen des Patienten-Kollektivs drei Tumortypen (PT, DTC und Met) isoliert. Alle drei Tumortypen wurden mittels der komparativen Genomhybridisierung (CGH) auf chromosomale Veränderungen hin untersucht. Mittels der SSCP (single strand conformation polymorphism) auf das Mutationsvorkommen der Onkogenen B-RAF und N-RAS. Desweiteren wurden die disseminierten Einzelzellen (DTC) aus dem Wächter-Lymphknoten (SLN) auf das Cyclin D1 Gen mittels einer qPCR analysiert (**Abbildung 10**; Lymphozyten-Kontrollzellen aus gesunden Spendern dienten als Referenz).



**Abbildung 10: Experimentelles Vorgehen**

**Histologie-Subtypen:** SSM = superfiziell spreitendes Melanom, ALM = Akrolentiginöses Melanom, NM = Noduläres Melanom, andere = Sonderformen.

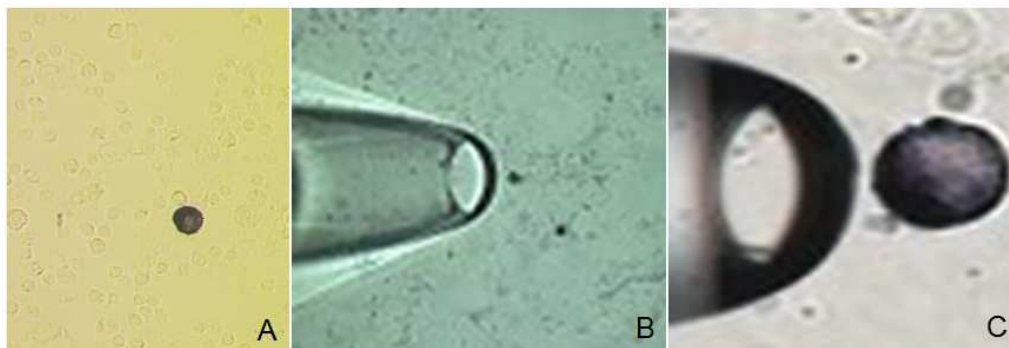
**Tumortypen:** Primärtumor (PT), disseminierte Tumoreinzelle (DTC) und Metastasen (Met); DTC pN1 = DTC aus histopathologisch positiver SLN; DTC pN0 = DTC aus histopathologisch negativen SLN.

**Methoden:** CGH = komparative Genomhybridisierung, SSCP = single strand conformation polymorphism, qPCR = quantitative PCR.

### 4.1 Immunzytochemischer Nachweis und Isolierung von Tumorzellen

#### 4.1.1 Gewinnung von disseminierten Tumoreinzelnzellen

Disseminierte Tumoreinzelnzellen (DTC, entsprechen den engl. Begriff DCC = disseminated cancer cell oder CTC = circulating cancer cells) aus den Wächter-Lymphknoten (SLN) von Patienten mit malignem Melanom liegen in einer niedrigen Frequenz vor. Um diese Zellen zu finden, wurde mit Hilfe des Kooperationspartners der Universität Tübingen das SLN-Gemisch durch eine Percolldichtegradienten-Zentrifugation angereichert und auf Adhäsions-Objektträger gebunden. Zur Detektion der Melanozyten wurde der monoklonale Antikörper HMB45 (gp100) verwendet (**Abbildung 11**). In der **Tabelle 37** im Anhang sind die genauen Zellzahlen der Färbungen aufgelistet. Die HMB45-positiven Zellen wurden mit einem Glaskapillar-Mikromanipulator von den Haft-Objektträgern isoliert (**Abbildung 11 C**). Pro Patient wurde versucht mindestens 3 Einzelzellen zu entdecken und zu isolieren, um daraus genomische DNA zu amplifizieren. Die Technik der Zellisolation wurde vom Kooperationspartner eingehend evaluiert (Ulmer *et al.*, 2005; **Abschnitt 3.1.1**).



**Abbildung 11: Mikromanipulator-assistierte Isolation von einer HMB45-positiven DTC**

**A:** Eine HMB45-positive DTC neben ungefärbten SLN Normalzellen (40fach Vergrößert). **B:** Isolation einer DTC mit einer Glaskapillare. **C:** Aufnahme der DTC (rein gezoomt).

Diese Methode ermöglichte auch die quantitative Dokumentation der Tumorlast im Lymphknoten, durch Quantifizierung positiver Zellen pro Million Lymphozyten, dem sogenannten DCCD-Wert (**D**isseminated **C**ancer **C**ell **D**ensity). Sie besitzt eine sehr hohe Sensitivität im Vergleich zur Routinopathologie (Ulmer *et al.*, 2005; Ulmer *et al.*, 2014). Der DCCD-Wert lag in diesem Kollektiv zwischen 1 und 800000 HMB45 positiven Zellen pro Million (96 % der Patienten hatten einen DCCD > 0). Eine Auswertung anhand der DCCD-Werte wurde

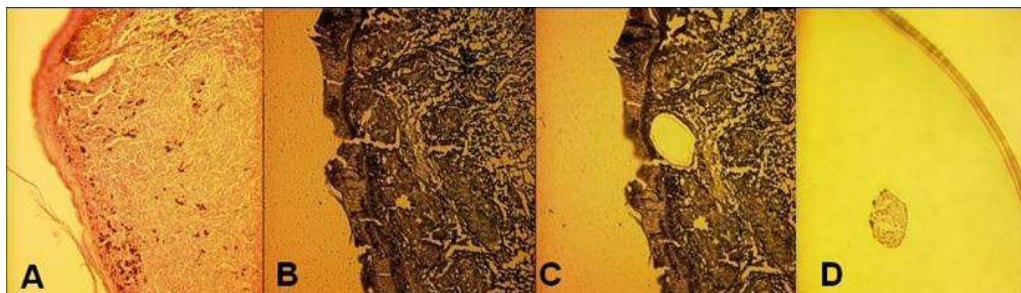


## 4. Ergebnisse

in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Die Analyse war Bestandteil einer weiteren Dissertation aus der Arbeitsgruppe Klein (Sebastian Scheitler; aktuell wurde das Kollektiv mit DCCD = 0 Zellen aufgestockt und analysiert (Ulmer (Hodak) *et al.*, 2014)).

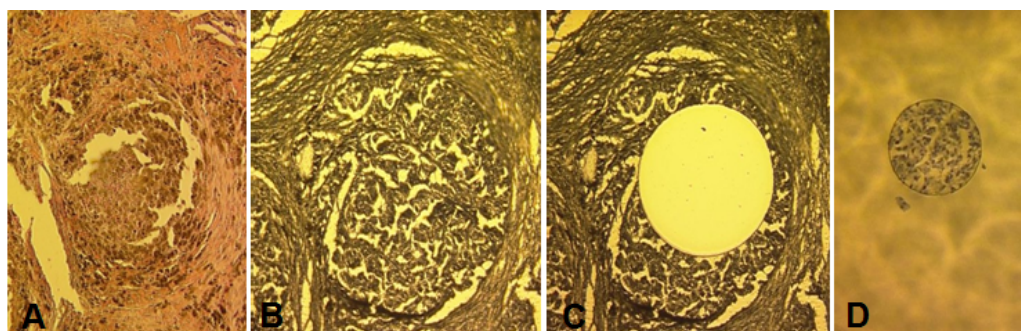
### 4.1.2 Gewinnung von Primärtumor- und Metastasen-Arealen

Nach der Hämatoxylin/Eosin (H/E)-Färbung von den Paraffinschnitten (**Abschnitt 3.1.2**) wurden die malignen Primärtumor- und Metastasen-Areale (**Abbildung 12** und **Abbildung 13**) mittels eines PALM-Laser-Microbeam-Systems mikrodisektiert. Der Laser katapultierte die ausgeschnittenen Areale durch einen Laserimpuls in den Deckel eines Reaktionsgefäßes. Pro Probe wurden insgesamt 200.000  $\mu\text{m}^2$  Gewebeareal gelasert (min. drei unterschiedliche Areale pro Patient). Da die Primärtumore des malignen Melanoms recht klein waren, war es nicht immer möglich mehrere Gewebeareale zu lasern um genug genomische DNA zu erhalten.



**Abbildung 12: Mikrodissektion von einem Primärtumor**

**A:** Übersicht einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Primärtumors. **B:** Gleiche Primärtumorregion in der Hämatoxylin-Färbung auf der PEN Folie. **C:** Mikrodissektion des tumorösen Areals. **D:** Gelasertes Areal im Deckel eines Reaktionsgefäßes.



**Abbildung 13: Mikrodissektion von einer Metastase**

**A:** Übersicht einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung einer Metastase. **B:** Gleiches Areal in der Hämatoxylin-Färbung auf der PEN Folie. **C:** Mikrodissektion des tumorösen Areals. **D:** Gelasertes Areal im Deckel eines Reaktionsgefäßes.

### 4.1.3 Gewonnenes Probenkollektiv

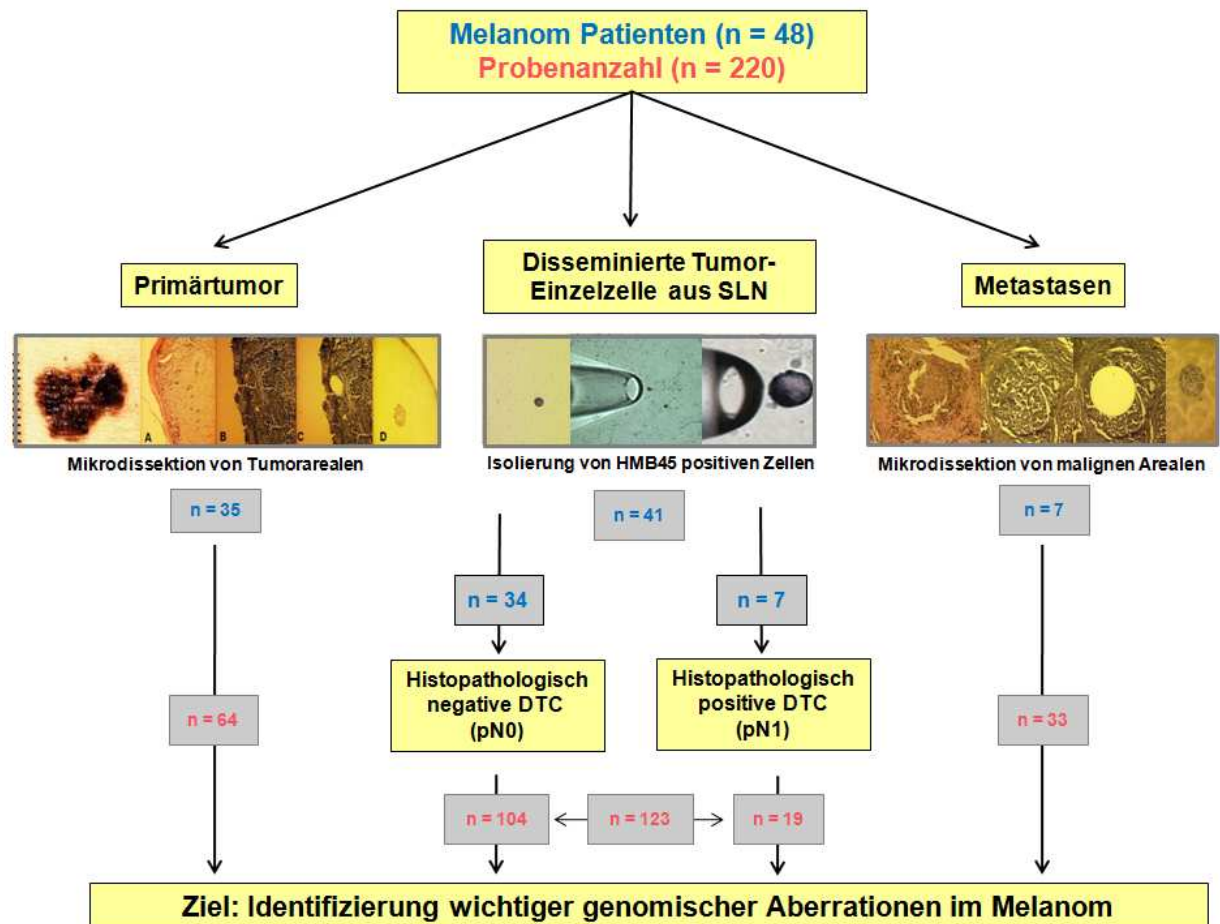
Mit der von der AG Klein (Klein *et al.*, 1999) entwickelten Mse-Adapter-PCR wurden die isolierten Melanom-Einzelzellen (DTC), die Primärtumor (PT)- und die Metastasen (Met)-Areale global amplifiziert (**Abschnitt 3.1.4**). Um die Qualität des primären PCR-Produktes zu bestimmen, wurden spezifische genomische MseI Fragmente nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde eine Kontroll-PCR durchgeführt. Dabei wurden für die DTC die Primerpaare für das TP53 (p53 Exon 2/3) und Keratin 19 Pseudogene 1 (CK 19; Pseudogen KRT19P1) verwendet. Für die lasermikrodissektierten Areale wurden die Mikrosatellitenmarker D5S500 und D16S485 verwendet, da die DNA bei der Gewinnung aus Paraffingewebe zum Teil in kleineren Fragmenten vorlag. Bei zwei positiven spezifischen Kontroll-PCR Ergebnissen wurde von einer qualitativ guten Ausgangsprobe ausgegangen. Wenn sich kein positives Ergebnis in der Gelelektrophorese zeigte, wurde die Probe nicht weiter verwendet (**Abschnitt 3.1.4, Abbildung 5**).

Aus allen drei Stadien der systemischen Melanomerkrankung konnten DNA-Proben archiviert werden. Von insgesamt 4 Patienten konnte gar kein Probenmaterial (DNA von PT und DTC) gewonnen werden. In der **Tabelle 36** im Anhang ist das gewonnene Probenkollektiv detailliert aufgelistet. Von 48 Patienten mit insgesamt 220 isolierten Tumortypen (PT, DTC und Met) standen für diese Arbeit zur Analyse zur Verfügung:

1. **Primärtumor-Proben:** Aus 35 Patienten, von den insgesamt 48 Patienten, wurden 64 Primärtumorproben isoliert. Von 13 Patienten war keine Primärtumorprobe zu bekommen.
2. **Disseminierte Tumoreinzelzellen aus Wächterlymphknoten (DTC):** Von insgesamt 41 Patienten wurden erfolgreich 123 DTC isoliert. Davon war der SLN bei 34 Patienten histopathologisch negativ (pN0; 104 isolierte Zellen) eingestuft worden und bei 7 Patienten histopathologisch positiv (pN1; 19 isolierte Zellen). Von 7 Patienten konnte keine DTC-Probe isoliert werden.
3. **Metastasen-Proben:** Von insgesamt 7 Patienten sind Metastasen aus verschiedenen Organen (z.B.: Lunge, Lymphknoten, Haut und Intransit Filiae) vorhanden. Hier wurden insgesamt 33 Metastasen-Proben erfolgreich isoliert.

#### 4. Ergebnisse

In der **Abbildung 14** ist zur besseren Übersicht eine schematische Gliederung des hier gewonnenen Patienten- und Probenkollektivs dargestellt. Zudem gibt die **Tabelle 8** eine Übersicht der wichtigsten Untergruppen des hier verwendeten Kollektivs wieder.



**Abbildung 14:** Anzahl des Patienten- und Probenkollektivs in den einzelnen Tumortypen (PT, DTC, Met)

Blau = Patientenanzahl; Rot = Probenanzahl.

Je nach verwendeter Methode (CGH, SSCP oder qPCR) ist eine unterschiedliche Anzahl an Proben zur Auswertung vorhanden, da nicht alle Proben in den einzelnen Versuchen auswertbar waren. Die jeweilige Proben-Anzahl ist im Ergebnis-Teil der einzelnen Methoden kurz aufgelistet. Aus diesem Grund wurde in den einzelnen Auswertungen zudem das Patientenkollektiv in 3 verschiedene Auswertungsgruppen eingeteilt, die wie folgt benannt wurden:

- **Gesamtes Kollektiv:** Grundsätzlich wurde hier immer eine Auswertung mit allen Proben, die in diesem Versuch auswertbar waren, durchgeführt.

#### 4. Ergebnisse

- **PT/DTC-Paare:** Hier wurden nur die Proben beachtet, von denen jeweils eine Primärtumor-Probe und eine DTC-Probe vom selben Patienten vorhanden waren.
- **PT-DTC-Met Triplet:** Hier wurden nur die Proben von den Patienten beachtet, von denen jeweils eine Primärtumor-Probe, eine DTC-Probe und eine Metastasen-Probe vorhanden waren.

**Tabelle 8:** *Einteilung des Patientenkollektives in Untergruppen*

n=48	Anzahl	Anzahl (%)
<b>Patienten</b>		
Männer	32	66,7
Frauen	16	33,3
<b>Alter bei PT-OP</b>		
< 29	2	4,2
30-40	8	16,7
41-50	7	14,6
51-60	4	8,3
61-70	16	33,3
>70	11	22,9
<b>Histologie</b>		
SSM	23	47,9
ALM	7	14,6
NM	11	22,9
andere	7	14,6
<b>Breslow</b>		
pT1 (0-1,00 mm)	2	4,2
pT2 (1,01-2,00 mm)	22	45,8
pT3 (2,01-4,00 mm)	13	27,1
pT4 (> 4,0 mm)	9	18,8
k.A.	2	4,2
<b>Lymphknotenstatus</b>		
pN0	39	81,3
pN1	9	18,8
<b>Clark-Level</b>		
I	0	0
II	0	0
III	15	31,3
IV	23	47,9
V	8	16,7
k.A.	2	4,2

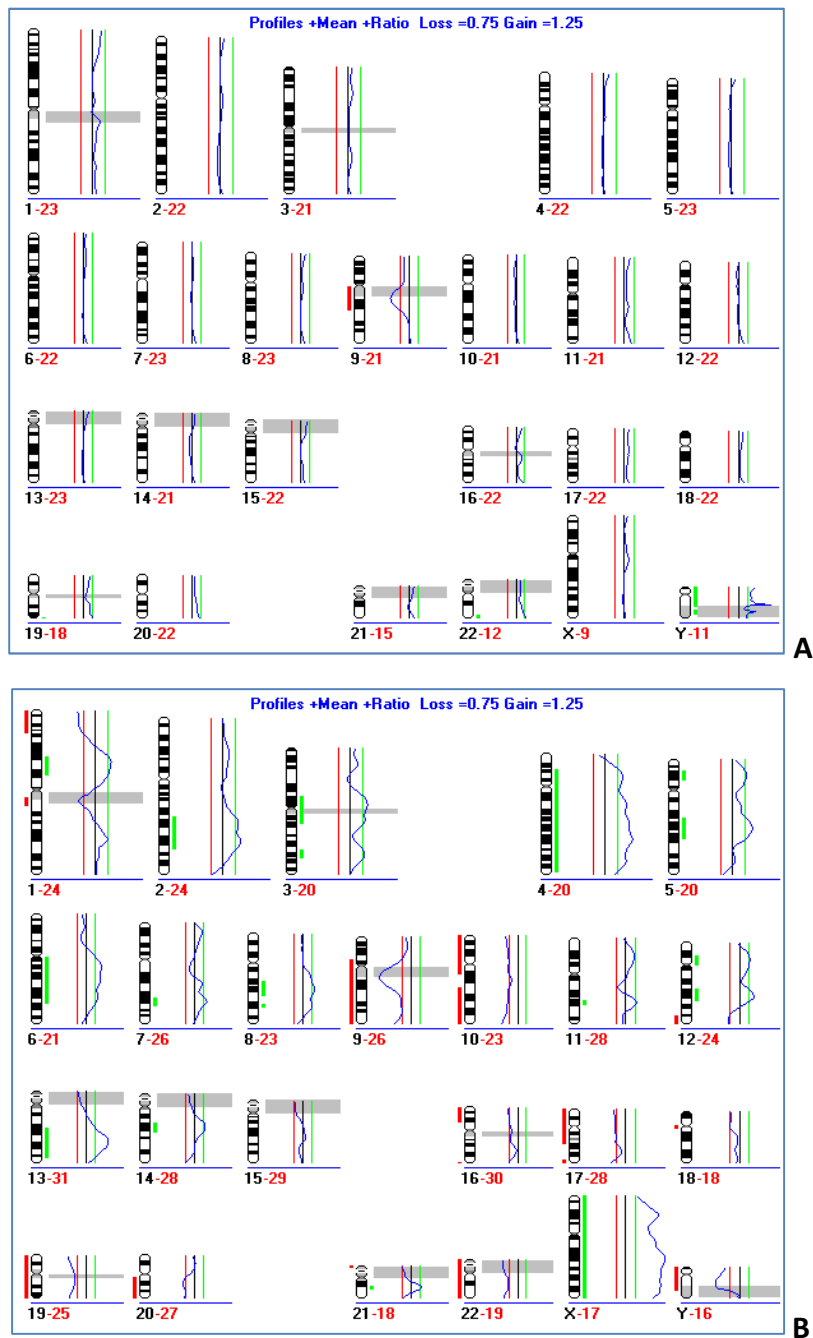
### 4.2 Identifizierung geteilter und charakteristischer Genomveränderungen des malignem Melanoms

#### 4.2.1 Probenkollektiv für die CGH-Analysen

Mit der Metaphasen-CGH konnte ein erster Überblick über die Veränderungen der verschiedenen Tumortypen gewonnen werden. Nicht von allen vorhandenen Proben konnte ein CGH-Profil erstellt werden. Für jede Probe wurde für jedes einzelne Chromosom ein Verhältnisprofil der Fluoreszenzintensitäten erstellt (CGH-Profil; s. **Anhang Abschnitt 10.3**), an dem relative Zugewinne (Amplifikationen) und Verluste (Deletionen) von DNA-Sequenzen in den entsprechenden chromosomalen Abschnitten in Form einer Verschiebung des Ratioprofils abzulesen waren (Beispiele s. **Abbildung 15**).

Für die Auswertung der CGH-Profile des gesamten Kollektivs standen somit 28 PT-, 44 DTC- und 9 Met-Profile zur Verfügung (n=81; inklusiv der 7 balancierten DTC-Normalprofilen, **Tabelle 9 A**). 16 % der HMB45 positiven DTC zeigten in diesem Kollektiv ein normales CGH-Profil und 84 % sind aberrant. Für die Auswertungen hierarchische Ähnlichkeitsanalyse (Cluster) und Progenetik-Analyse wurden die Normalprofile nicht mit einbezogen. Folglich bleiben 37 aberrante DTC-Profile (von 28 Patienten) für diese Auswertung übrig.

Für die Auswertung der PT/DTC-Paare (**Tabelle 9 B**) waren 25 PT-Profile und 30 DTC-Profile (inkl. 6 balancierten Profilen) vorhanden. Dies entspricht 20 Patienten, von denen jeweils eine PT-Probe und eine DTC-Probe, existierten. Für die Auswertungen entfiel jedoch ein Patient (Patient Nr. 16), da von ihm nur ein DTC-Profil als Normalprofil vorhanden war. Aus diesem Grund standen nur noch 19 Patienten zur Verfügung (23 PT- und 24 DTC-Proben).



**Abbildung 15: Balanciertes und aberrantes CGH-Profil**

**A:** Balanciertes Normalprofil einer disseminierten Tumor-Einzelzelle (16 DTC 01). Das gemittelte Profil aller Chromosomen dieser DTC verläuft in der Mittellinie. Es sind weder Abweichungen nach rechts (Amplifikation) noch nach links (Deletion) sichtbar. **B:** Aberrantes CGH-Profil einer Primärtumor-Probe (30 PT 02). Das gemittelte Profil aller Chromosomen dieses PTs verläuft nicht an der Mittellinie. Es sind viele Abweichungen nach rechts (Amplifikation; grüne Balken) und nach links (Deletion; rote Balken) sichtbar. Die grauen Balken geben Chromosomenregionen mit repetitiven Sequenzen an. Veränderungen in diesen Bereichen werden nicht gewertet. Die erste Zahl (schwarz, unterhalb des Chromosoms) benennt das jeweilige Chromosom und die zweite Zahl (rot) gibt die in die Auswertung eingegangenen Chromosomen aus den Metaphasen an, z.B. in Bild A: das Chromosom 2 22 mal zur Berechnung des Mittelwertes einbezogen = 11 untersuchten Metaphasen. Abweichende Zahlen zeigen, dass einzelne Metaphasen nicht komplett waren und das nicht alle Chromosomen in die Auswertung mit einbezogen werden konnten (Chromosom 22 nur 12 mal).

**Tabelle 9: Anzahl der CGH-Profile****A)**

gesamtes Kollektiv	CGH-Profile				Cluster-Analyse	
	Proben (n=81)		Patient (n=48)		Proben	Patienten
	aberrant	NP	aberrant	NP		
PT	28	0	23	0	28	23
DTC	37	7	28	6	37	28
Met	9	0	5	0	9	5
Summe	74	7			74	33
DTC pN0	27	5	23	5	27	23
DTC pN1	10	2	5	1	10	5

**B)**

PT/DTC-Paare	CGH-Profile				Cluster-Analyse	
	Proben n=55		Patient n=20		Proben	Patienten
	aberrant	NP	aberrant	NP		
PT	25	0	20	0	23	19
DTC	24	6	19	5	24	19
Summe	49	6			47	19
DTC pN0	20	4	17	4	20	16
DTC pN1	4	2	3	1	4	3

**A:** Anzahl der CGH-Profile des gesamten Kollektivs auf Proben- und Patientenebene, die zur Auswertung der Histogramme und Cluster-Analyse zur Verfügung stehen. **B:** Anzahl der CGH-Profile für die Auswertung der PT/DTC-Paare auf Proben- und Patientenebene, die zur Auswertung der Histogramme und Cluster-Analyse zur Verfügung stehen.

#### 4.2.2 Chromosomale Veränderungen des malignen Melanoms

An erster Stelle sollte geklärt werden, ob die chromosomalen Veränderungen mit der Ausbreitung der Erkrankung (PT -> DTC und auch -> Met) zunehmen. Dazu wurde die vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) durchgeführt, um die genomischen Ungleichgewichte der einzelnen Tumortypen (PT, DTC und Met) zu überprüfen und zu vergleichen. Mit Hilfe des freien Internet Programms von Progenetix (Baudis; [www.progenetix.de](http://www.progenetix.de)) wurden die ermittelten CGH-Profile gruppiert und analysiert. In den so erhaltenden Histogrammen wurden die Amplifikationen (Gewinne; Grün) und Deletionen (Verluste; Rot) prozentual nach dem Auftreten angezeigt. Die Häufigkeitsverteilung der Aberrationen wurde hier ohne die Normalprofile berechnet. Um einen besseren Vergleich der Tumortypen zu erhalten, wurde hier eine andere Bild-Version, ein Histoplot, gewählt. Die Ideogramme der Tumortypen sind im Anhang aufgeführt (**Abschnitt 10.3.1**).

91 % der analysierten Zellen zeigten Chromosomenaberrationen innerhalb der Nachweisgrenze der Metaphasen CGH (10-20 Mb). Da alle Kontroll-Zellen (Lymphozyten) aus



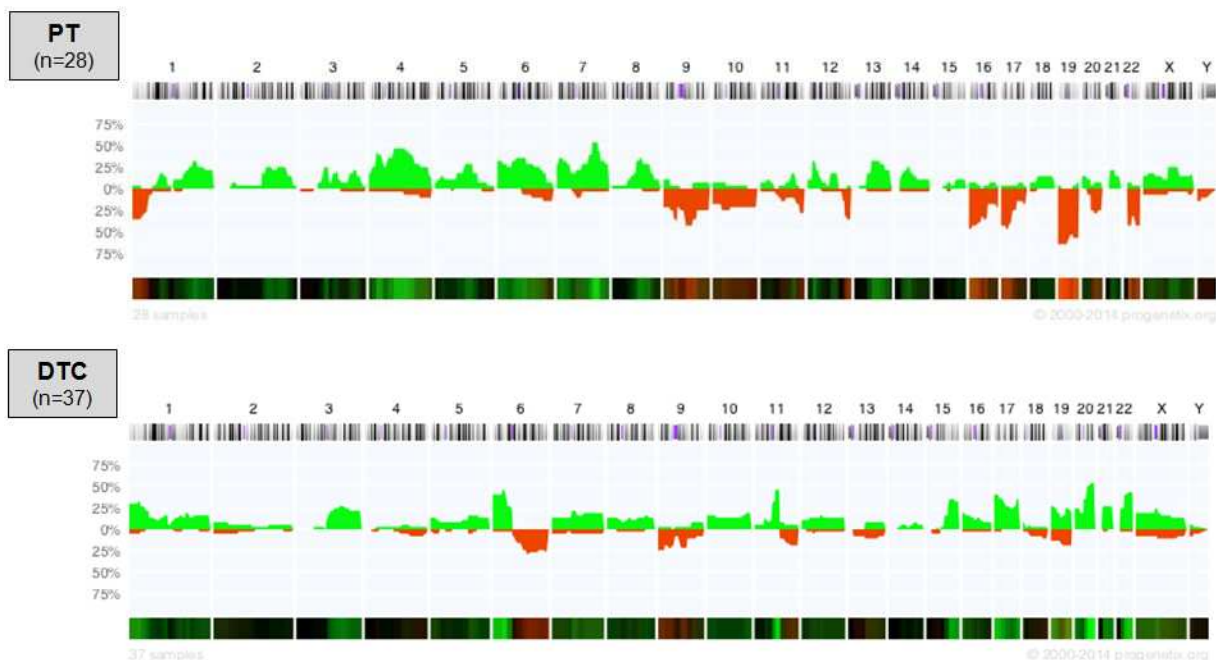
#### 4. Ergebnisse

gesunden Spendern ein balanciertes Normalprofil aufwiesen, zeigt, dass durch die CGH-Technik keine künstlichen chromosomalen Veränderungen eingeführt wurden (s. **Anhang 10.3.3**).

##### Gesamtes Kollektiv

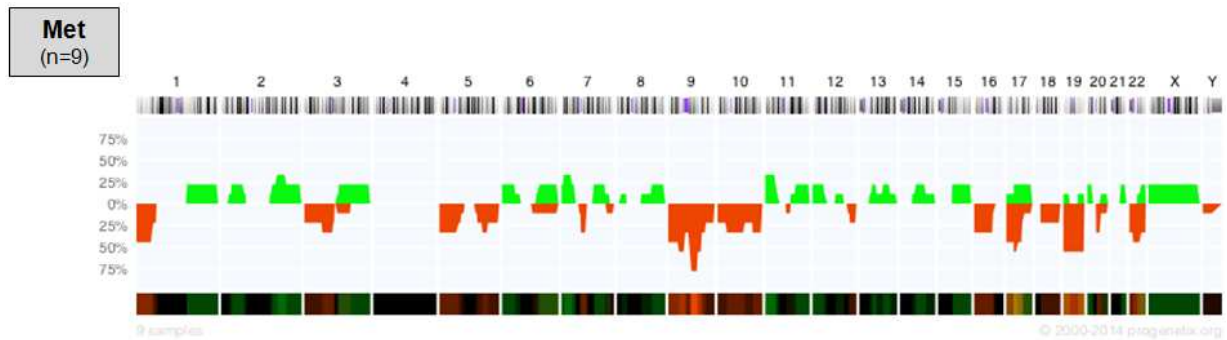
Anhand der Histoplot Bilder erkennt man, dass es in diesem Kollektiv insgesamt mehr Zugewinne gab als Verluste (**Abbildung 16**). Die Proben der Primärtumoren zeigen hier mehr Deletionen und Amplifikationen (die über das gesamte Genom verteilt vorkommen). Bei den disseminierten Tumoreinzellen sind ganz andere Chromosomenregionen, als bei den Primärtumoren, verändert. Hier zeigen sich insgesamt mehr Zugewinne als Verluste. Die Metastasen dagegen zeigen mehr Deletionen als Amplifikationen.

Hervorzuheben sind die aberranten Chromosomenregionen, die sogar bei über 50 % der Proben vorkamen. Bei den Primärtumoren sind das die Zugewinne auf dem Chromosom 4q und 7q22q23 und die Verluste auf dem Chromosom 19 und 22q. Bei den Metastasen die Deletionen auf Chromosom 9 und 19 und bei den DTC ist die Amplifikation auf Chromosom 20q in über 50 % der Proben vorhanden.





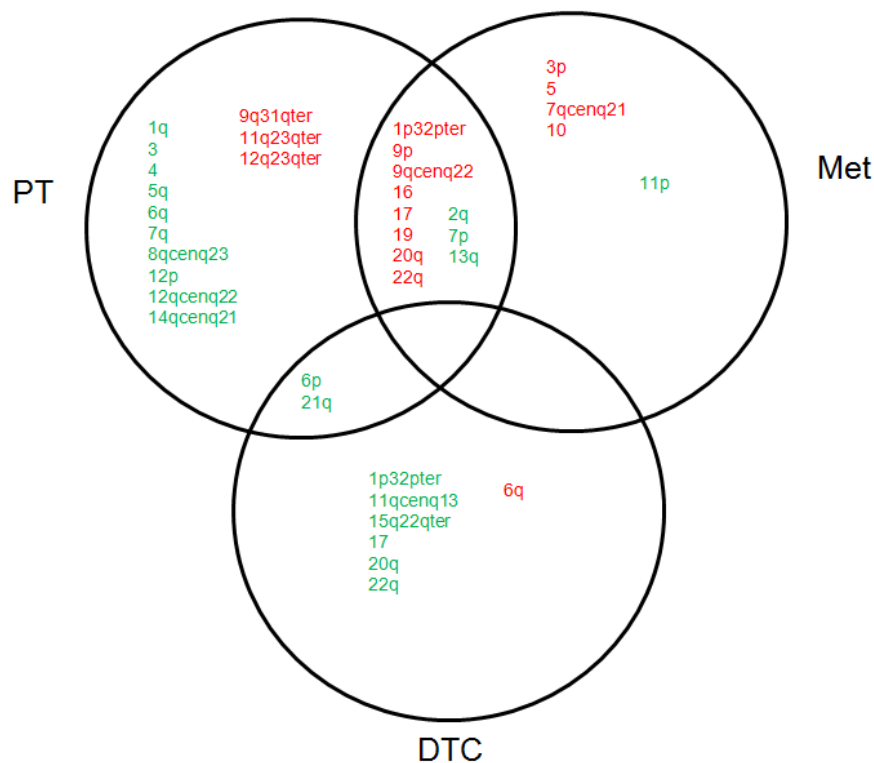
#### 4. Ergebnisse



**Abbildung 16: Histoplot Bilder der PT, DTC und der Metastasen des gesamten Kollektivs**

Als grüne Balken sind die Amplifikationen und roten Balken die Deletionen dargestellt. Progenetix Version 2000-2014; M. Baudis; [www.progenetix.de](http://www.progenetix.de).

Zur besseren Darstellung der CGH Ergebnisse wurde in **Tabelle 10** die häufigsten aberranten Chromosomenregionen in den einzelnen Tumortypen aufgelistet (die komplette 54 Bänderungsliste ist im Anhang aufgeführt (**Tabelle 38**). Anhand der daraus resultierenden Schnittmengendarstellung (**Abbildung 17**) wurde deutlich, dass sich die Primärtumore und die Metastasen deutlich mehr Aberrationen in bestimmten Chromosomenregionen teilen, als die Primärtumore mit den disseminierten Einzelzellen oder die Metastasen mit den disseminierten Einzelzellen.



**Abbildung 17: Schnittmengen von Chromosomenregionen zwischen PT, DTC und Met**

Alle Chromosomenregionen die in über 25 % der Proben vorkamen. Deletion (rot) Amplifikation (grün).

#### 4. Ergebnisse

**Tabelle 10: Prozentuales Vorkommen von aberranten Chromosomenregionen in den Tumortypen**

Chromosomenregion	PT (n=28)		DTC (n=44)		Met (n=9)		DTC pN0 (n=32)		DTC pN1 (n=12)	
	Del (%)	Amp (%)	Del (%)	Amp (%)	Del (%)	Amp (%)	Del (%)	Amp (%)	Del (%)	Amp (%)
1p32pter	35,7	3,6	4,5	27,3	44,4	0,0	3,1	37,5	8,3	0,0
1q	3,6	28,6	2,3	18,2	0,0	22,2	0,0	21,9	8,3	8,3
2q	0,0	28,6	4,5	4,5	0,0	33,3	3,1	6,3	8,3	0,0
3p	3,6	25,0	0,0	0,0	33,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3q	3,6	25,0	0,0	22,7	11,1	22,2	0,0	25,0	0,0	16,7
4p	3,6	46,4	2,3	2,3	0,0	0,0	3,1	0,0	0,0	8,3
4q	10,7	53,6	6,8	4,5	0,0	0,0	9,4	0,0	0,0	16,7
5p	0,0	21,4	6,8	11,4	44,4	0,0	3,1	15,6	16,7	0,0
5q	3,6	35,7	6,8	13,6	44,4	0,0	3,1	18,8	16,7	0,0
6p	0,0	46,4	2,3	38,6	0,0	22,2	3,1	43,8	0,0	25,0
6q	14,3	28,6	25,0	0,0	11,1	22,2	21,9	0,0	33,3	0,0
7p	3,6	39,3	4,5	11,4	11,1	33,3	6,3	15,6	0,0	0,0
7qcenq21	10,7	25,0	4,5	18,2	33,3	0,0	6,3	25,0	0,0	0,0
7q22q32	3,6	53,6	4,5	18,2	0,0	22,2	6,3	25,0	0,0	0,0
7q33qter	3,6	32,1	4,5	18,2	11,1	0,0	6,3	25,0	0,0	0,0
8qcenq23	3,6	35,7	2,3	13,6	0,0	22,2	3,1	18,8	0,0	0,0
9p	39,3	10,7	20,5	4,5	55,6	0,0	15,6	6,3	33,3	0,0
9qcenq22	46,4	7,1	18,2	2,3	77,8	0,0	9,4	3,1	41,7	0,0
9q31qter	28,6	7,1	13,6	6,8	22,2	0,0	9,4	9,4	25,0	0,0
10p	21,4	7,1	0,0	13,6	33,3	0,0	0,0	15,6	0,0	8,3
10q	21,4	3,6	0,0	15,9	33,3	0,0	0,0	18,8	0,0	8,3
11p	10,7	10,7	0,0	15,9	0,0	33,3	0,0	12,5	0,0	25,0
11qcenq13	14,3	7,1	0,0	38,6	11,1	0,0	0,0	40,6	0,0	33,3
11q23qter	25,0	0,0	13,6	4,5	0,0	22,2	15,6	3,1	8,3	8,3
12p	0,0	28,6	2,3	11,4	0,0	22,2	3,1	15,6	0,0	0,0
12qcenq22	0,0	25,0	4,5	11,4	0,0	11,1	6,3	15,6	0,0	0,0
12q23qter	32,1	3,6	2,3	11,4	22,2	0,0	3,1	15,6	0,0	0,0
13q	3,6	32,1	9,1	6,8	0,0	33,3	12,5	9,4	0,0	0,0
14qcenq21	3,6	28,6	0,0	4,5	0,0	0,0	0,0	6,3	0,0	0,0
15q22qter	0,0	10,7	0,0	29,5	0,0	22,2	0,0	31,3	0,0	25,0
16p	46,4	7,1	2,3	15,9	33,3	0,0	3,1	18,8	0,0	8,3
16q	35,7	7,1	2,3	11,4	33,3	0,0	3,1	15,6	0,0	0,0
17p	46,4	3,6	2,3	36,4	44,4	11,1	3,1	40,6	0,0	25,0
17q	39,3	7,1	0,0	36,4	44,4	22,2	0,0	37,5	0,0	33,3
19p	67,9	3,6	11,4	22,7	55,6	11,1	9,4	25,0	16,7	16,7
19q	67,9	7,1	18,2	18,2	55,6	11,1	18,8	18,8	16,7	16,7
20p	7,1	14,3	0,0	22,7	0,0	22,2	0,0	31,3	0,0	0,0
20q	32,1	7,1	0,0	45,5	44,4	11,1	0,0	53,1	0,0	25,0

#### 4. Ergebnisse

Chromosomenregion	PT (n=28)		DTC (n=44)		Met (n=9)		DTC pN0 (n=32)		DTC pN1 (n=12)	
	Del (%)	Amp (%)	Del (%)	Amp (%)	Del (%)	Amp (%)	Del (%)	Amp (%)	Del (%)	Amp (%)
21q	0,0	25,0	2,3	25,0	0,0	22,2	3,1	28,1	0,0	16,7
22q	53,6	10,7	2,3	36,4	33,3	22,2	3,1	37,5	0,0	33,3

Farblich sind die Chromosomenregionen hervorgehoben, die über 25 % in einem Tumortyp aberrant sind; ohne Gonosomen; Deletion (rot) Amplifikation (grün); komplette Auflistung der aberranten Chromosomenregionen ist in **Tabelle 38** im Anhang aufgeführt.

Um die aus der CGH gewonnen Aberrationen besser vergleichen zu können, wurden von den einzelnen Tumortypen die mittlere Anzahl der genetischen Veränderungen und der Median berechnet (**Tabelle 11**). Die mittlere Anzahl der genetischen Veränderungen war bei den Primärtumoren 12,6 (Reichweite 1-31) und bei den Metastasen 11,9 (Reichweite 1-28). Bei den DTC lag die mittlere Anzahl bei 8,8 (Reichweite 1-20; Einzelwerte in **Tabelle 38** im Anhang). Es zeigt sich hier, dass in den Deletionen ein signifikanter Unterschied zwischen Primärtumor und disseminierten Tumorzellen existiert ( $p=0.01$ ; Mann-Whitney-U-Test; p-Wert two-tailed). Auch bei den Deletionen zwischen PT, DTC und Met liegt ein p-Wert von 0.01 vor (Kruskal-Wallis Test ( $k=3$ ); p-Wert two-tailed).

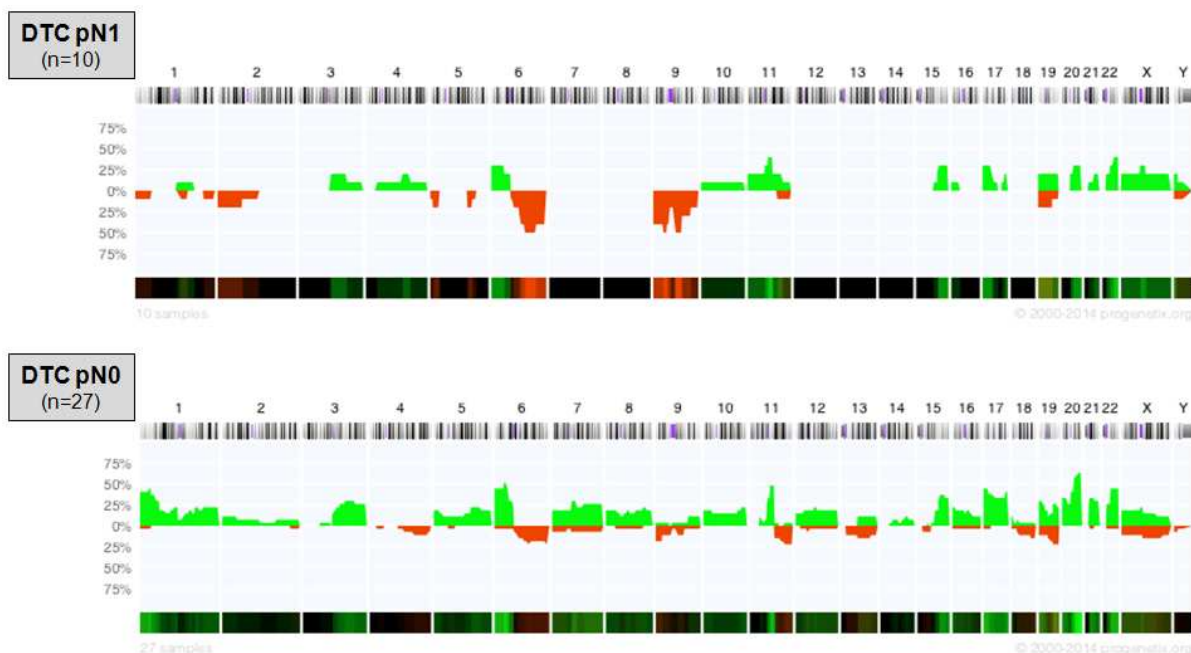
**Tabelle 11: Zusammenfassung der mittleren Anzahl der genetischen Veränderungen des gesamten CGH-Probenkollektivs**

Gesamtes Kollektiv	PT (n=28)			DTC (n=37)			Met (n=9)		
	Deletion	Amplifikation	Total	Deletion	Amplifikation	Total	Deletion	Amplifikation	Total
Minimum	0	0	1	0	0	1	0	0	1
1. Quartil	1	2	4	0	3	4	3	1	4
Median	4,5	4,5	12	1	7	9	7	2	9
Mittelwert	5,2	7,4	12,6	2,1	6,7	8,8	6,2	5,7	11,9
3.Quartil	9,25	10,75	17	4	9	12	9	5	18
Maximum	14	22	31	9	20	20	14	19	28
<b>p-Werte:</b>									
DTC vs PT*	Deletion: $p=0.01$			Amplifikation: $p=0.99$			Total: $p=0.13$		
PT vs DTC vs Met**	Deletion: $p=0.01$			Amplifikation: $p=0.38$			Total: $p=0.33$		
PT vs Met*	Deletion: $p=0.73$			Amplifikation: $p=0.22$			Total: $p=0.82$		
DTC vs Met*	Deletion: $p=0.02$			Amplifikation: $p=0.18$			Total: $p=0.63$		

Berechnung von Median, Mittelwert, 1. und 3. Quartil der einzelnen Tumortypen ohne Normalprofile.  $n=74$  Profile; p-Wert Berechnung: \*Mann-Whitney-U-Test; \*\*Kruskal-Wallis Test ( $k=3$ ); p-Wert two-tailed.

##### DTC aus pN0 versus DTC aus pN1

Die DTC sind im Patienten selten und in der Literatur wenig beschrieben. Daher ist es umso wichtiger diese Tumor-Einzelzellen genomisch zu charakterisieren. Dazu wurden die DTC hier zusätzlich nach dem eingestuften Lymphknotenstatus pN0 und pN1 aufgeteilt und analysiert, um die Zunahme (Expansion) im Lymphknoten zu betrachten (**Abbildung 18**). So erhielt man 27 DTC-Profile aus pN0-Stadium und 10 DTC-Profile aus pN1-Stadium (ohne Normalprofile). Durch diese Trennung zeigten die DTC aus dem pN0-Stadium ganz andere Veränderungen als die DTC aus dem pN1-Stadium. Die histopathologisch negativen Zellen wiesen vor allem mehr Zugewinne in den Chromosomen auf. Die DTC aus dem pN1-Stadium zeigen insgesamt deutlich weniger Aberrationen (**Abbildung 19**).



**Abbildung 18: Histoplot Bilder von DTC aus pN0 und pN1**

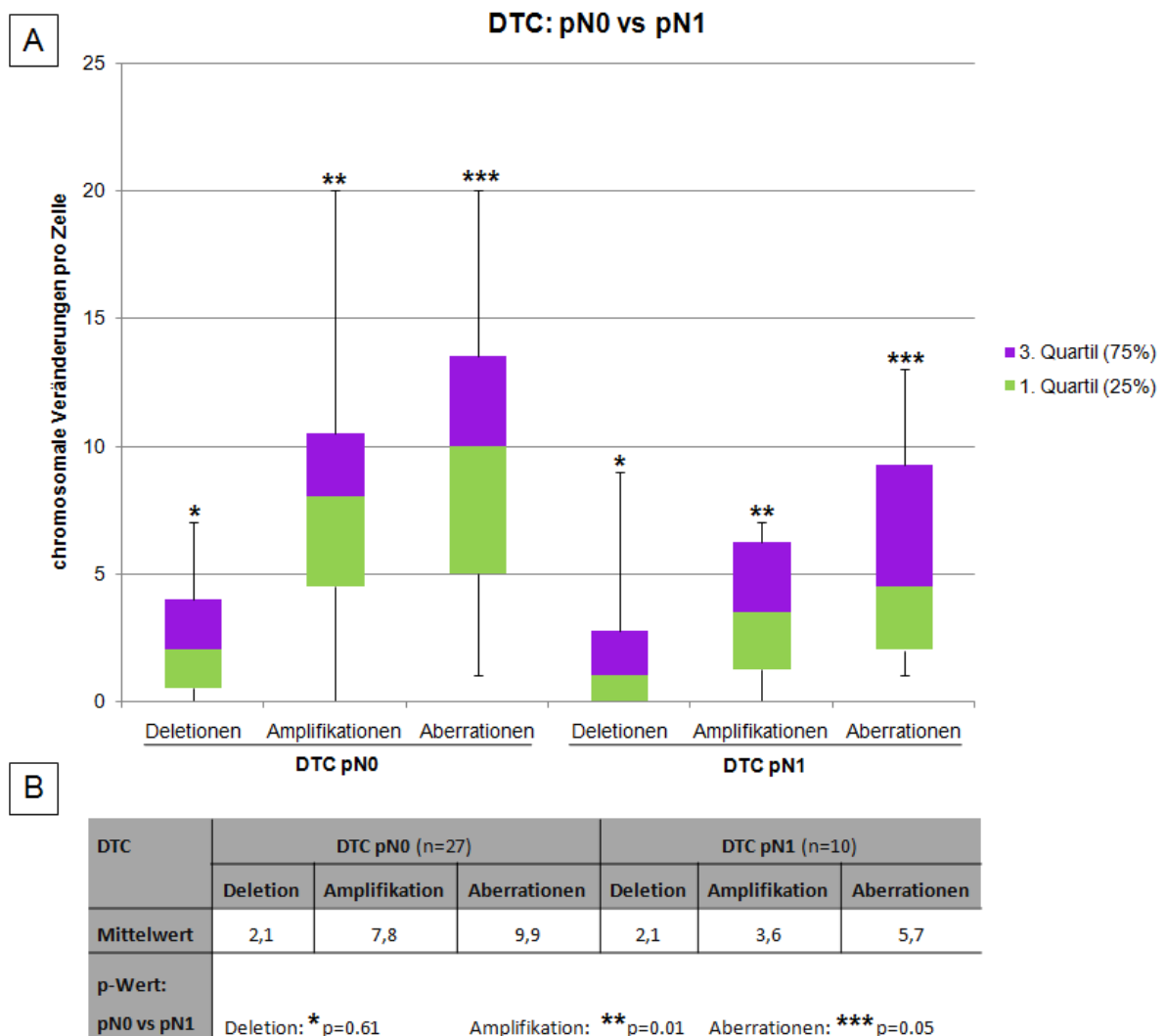
Als grüne Balken sind die Amplifikationen und roten Balken die Deletionen dargestellt. Progenetix Version 2000-2014.

Zur genaueren Darstellung der Streuungsdaten der Aberrationen von den DTC aus pN0- und pN1-Stadium wurde in **Abbildung 19 A** ein Boxplot Diagramm erstellt. Hier wurden alle Werte der Fünf-Punkte-Zusammenfassung (Median, 1. und 3. Quartil und die beiden Extremwerte) dargestellt. Der Median (horizontale Linie innerhalb der Box) befindet sich in der Box nicht mittig, die Box ist daher unsymmetrisch. Daher liegt hier keine Normalverteilung der Werte vor. Die mittlere Anzahl von den Deletionen bleibt jedoch im pN0- und pN1-Stadium mit 2,1

#### 4. Ergebnisse

gleich groß. Bei den Amplifikationen haben die DTC aus pN0-Stadium deutlich mehr Aberrationen, als die DTC aus pN1-Stadium ( $p=0.01$ ; Mann-Whitney-U-Test; p-Wert two-tailed). Insgesamt zeigt sich somit ein Gesamt p-Wert bei den Aberrationsmittelwerten von  $p=0.05$  (Mann-Whitney-U-Test; p-Wert two-tailed; **Abbildung 19 B**).

Die Aberrationen nehmen hier nicht mit der Zunahme im Lymphknoten zu. Die disseminierten Tumoreinzelzellen, die aus dem pN0-Stadium isoliert wurden, weisen mehr Zugewinne im Genom auf, als DTC aus dem pN1-Stadium. Hier sind die meisten Zugewinne der Chromosomen nicht mehr vorhanden.



**Abbildung 19: Chromosomalen Veränderungen in den DTC aus pN0- und pN1-Stadium**

**A:** Boxplot-Diagramm (Streuungsdiagramm) der DTC aus pN0- und pN1-SLN. Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50 % der Daten liegen. 1. Quartil (grün; 25 % der Datenwerte); 3. Quartil (lila; 75 % der Datenwerte); Median als horizontale Linie zwischen den beiden Boxen (50 % der Datenwerte); die Antennen zeigen die außerhalb der Box liegenden Werte an (die Länge der Antenne wird durch den maximalen und minimalen Wert festgelegt). **B:** Tabelle der Aberrationsmittelwerte. p-Wert Berechnung zwischen zwei Tumortypen mittels Mann-Whitney-U-Test; p-Wert two-tailed.

### 4.2.3 Ähnlichkeitsanalyse zwischen den Melanom Tumortypen

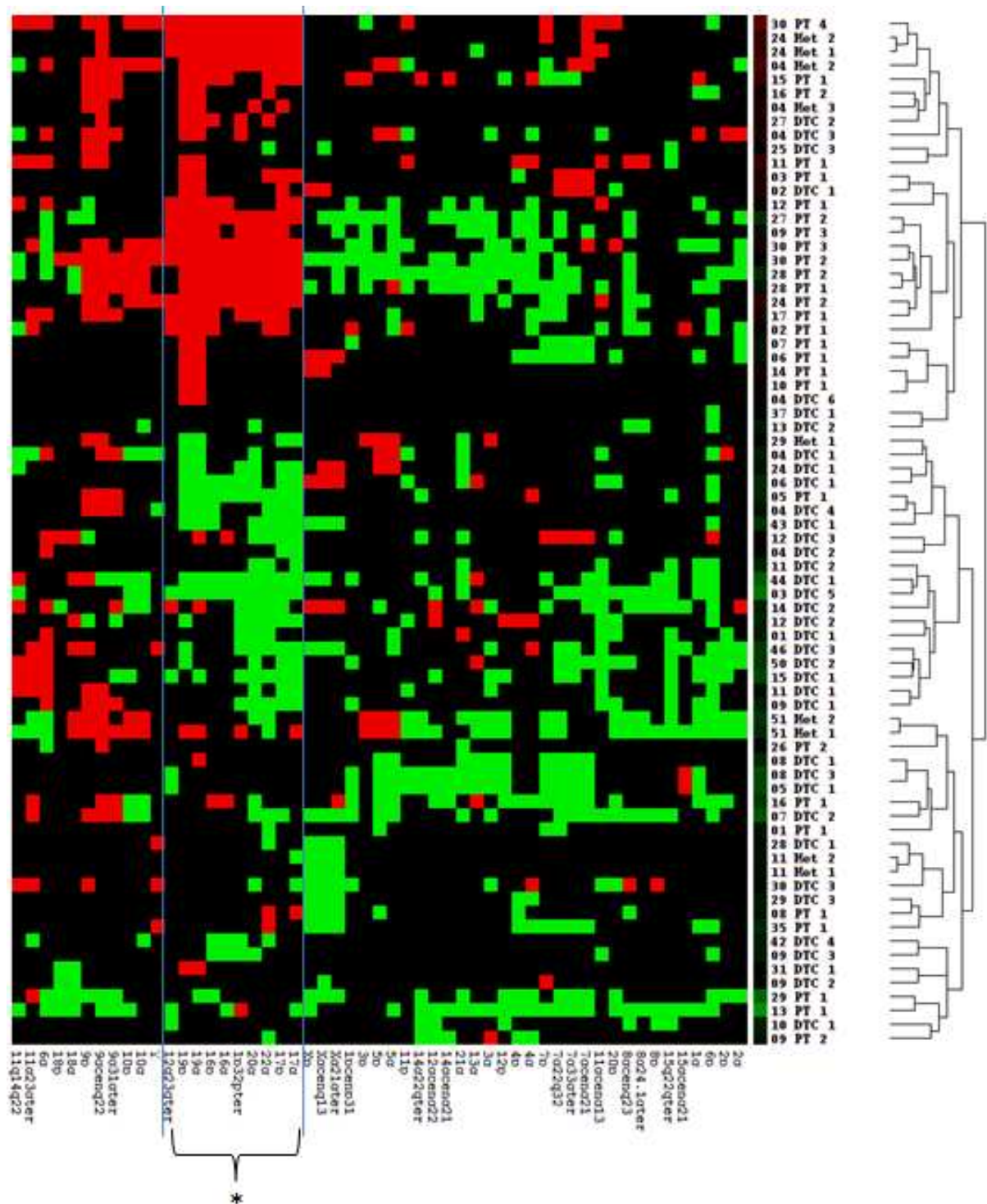
Um herauszufinden, ob eine Ähnlichkeit bzw. eine Verwandtschaft zwischen den Melanom Tumortypen besteht, wurde mittels der hierarchischen Cluster-Analyse bestimmt.

In **Abbildung 20** ist die Cluster-Analyse des gesamten Kollektivs dargestellt. Der Verwandtschaftsgrad einzelner Proben lässt sich durch das Dendrogramm am rechten Rand der Abbildung ablesen (das in **Abbildung 21 A** noch einmal vergrößert dargestellt ist). Je kürzer in dieser Abbildung die Astlänge zu einem Knoten zwischen zwei Proben ist, desto ähnlicher sind sich die Proben. Entgegengesetzt deuten die Aufzweigungen auf nur sehr entfernt ähnliche Proben hin. So erkennt man, dass es in der Ähnlichkeit der Proben zueinander immer wieder zu kleineren Gruppenbildungen kommt (**Abbildung 21 A**).

In der Gruppe 1 liegen 15 PT nah beieinander. In Gruppe 2 liegen 18 DTC beieinander. Unter den Metastasen-Proben kann man keine Gruppenbildung erkennen. Sie liegen, wie die restlichen PT- und DTC-Proben im ganzen Dendrogramm verteilt. Im oberen und unteren Bereich des Dendrogrammes kommen PT, DTC und Met gemischt vor.

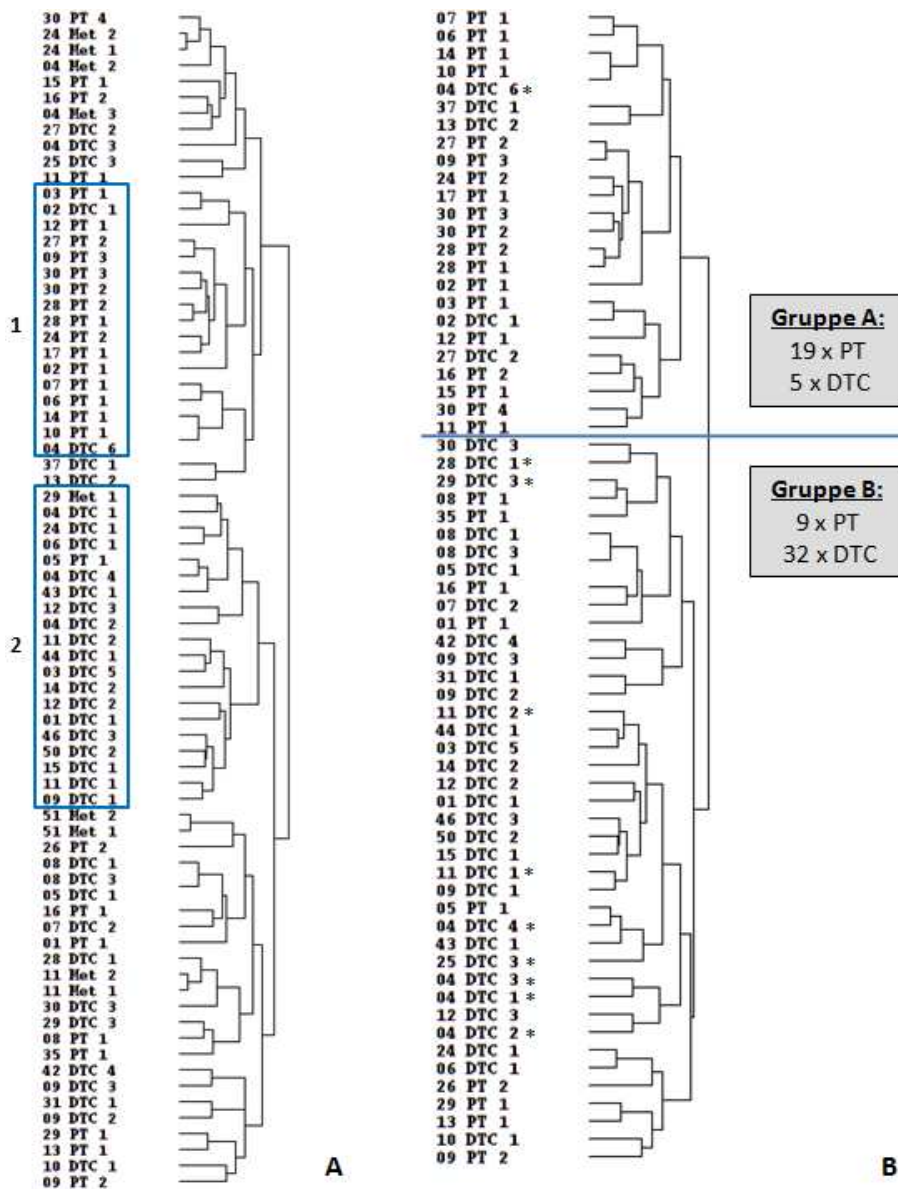
In einer Analyse ohne die Metastasen-Proben (**Abbildung 21 B**) wurde eine Gruppierung der Proben in zwei große Äste (Gruppe A und B) sichtbar. In der Gruppe A befinden sich 19 PT-Proben und nur 5 DTC-Proben und in der Gruppe B 9 PT-Proben und 32 DTC-Proben. In der Gruppe A liegen folglich mehr Primärtumor-Proben als in Gruppe B, das bedeutet, dass sich die PT auf genomischer Ebene insgesamt ähnlich sehen. In der Gruppe B sind sich dagegen die DTC zueinander ähnlich. Hier liegen, bis auf einen, alle DTC aus dem pN1-Stadium (\* in **Abbildung 21 B**). 5 von diesen DTC liegen in Gruppe B nah beieinander und sind sich damit sehr ähnlich. Prozentual gesehen sind sich 68 % der PT und ganze 86,5 % der DTC zueinander ähnlich. Diese große Trennung zwischen den PT und den DTC kommt vor allem dadurch zustande, dass in der Gruppe A gehäuft Deletionen in den Chromosomenregionen 1p, 12q, 16, 17, 19, 20q und 22q vorhanden sind. In der Gruppe B dagegen zeigen diese Chromosomenregionen einen Zugewinn (siehe \* in **Abbildung 20**).





**Abbildung 20: Hierarchische Clusteranalyse des gesamten CGH-Probenkollektivs**  
Cluster aller 74 Proben (PT, DTC und Met; complete linkage Methode). Unten die 54-Banden-Einteilung; rechts die Proben mit den Verwandtschaftsverhältnisse als Dendrogramm (Vergrößerung in **Abbildung 21 A**); Grüne Kästchen = Amplifikationen; rote Kästchen = Deletionen. \* Diese Chromosomenbereiche zeigen in Gruppe A einen Verlust und in Gruppe B einen Zugewinn.

#### 4. Ergebnisse



**Abbildung 21: Dendrogramme der Clusteranalyse des gesamten CGH-Probenkollektivs**

**A:** Dendrogramm des gesamten CGH-Probenkollektivs (PT, DTC und Met;  $n=74$ ), mit zwei Gruppenbildungen 1 und 2. **B:** Dendrogramm aller PT und DTC ( $n=65$ ), Aufteilung in zwei große Äste (Gruppe A und B). Links sind die einzelnen Proben aufgelistet, danach folgt rechts das dazugehörige Dendrogramm (complete linkage Methode). \* DTC aus pN1-Stadium.

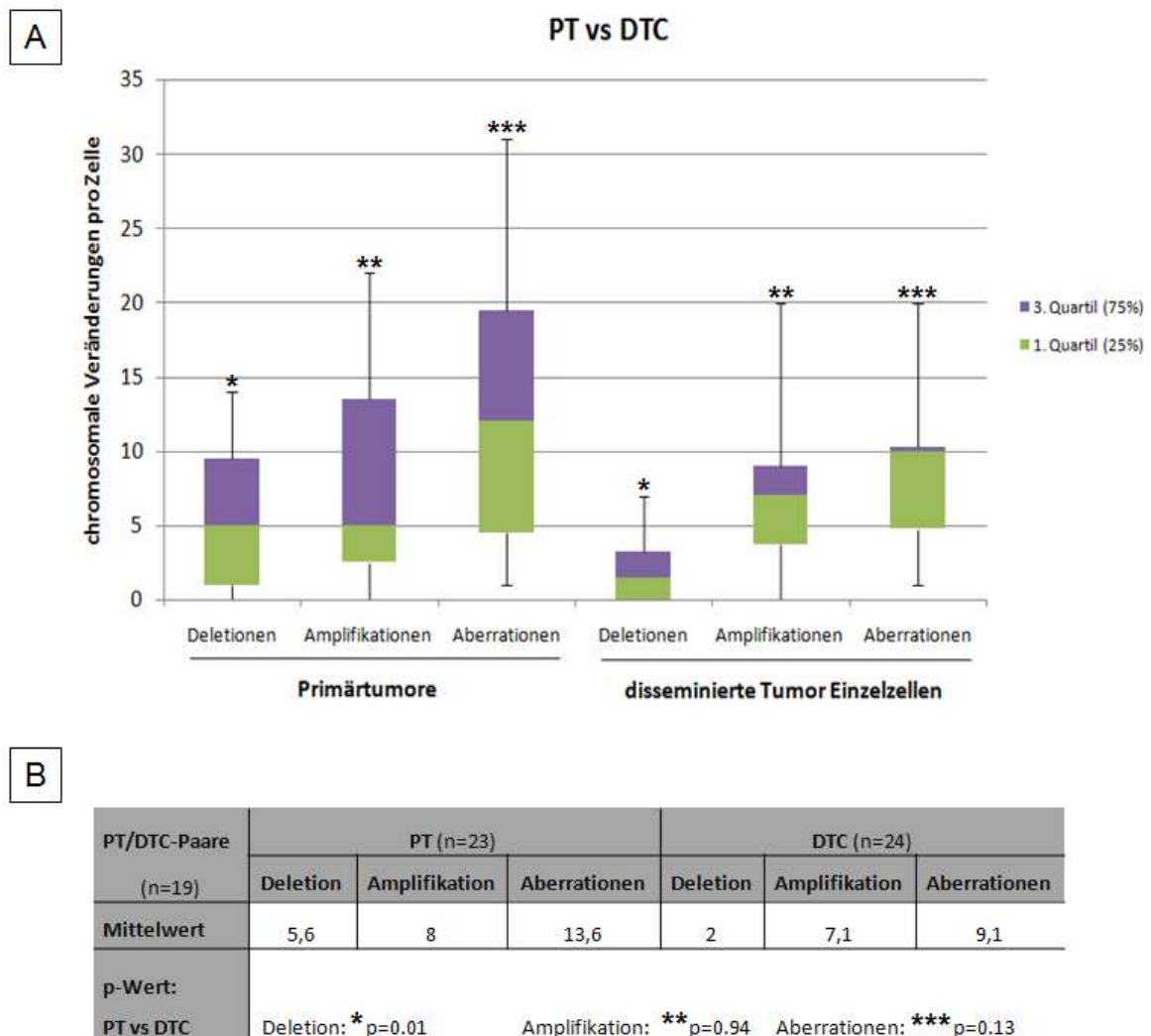
#### 4.2.3.1 Genomischer Vergleich von Primärtumoren und disseminierten Tumoreinzellen desselben Patienten

Für den direkten Vergleich zwischen Primärtumor und seinen disseminierten Tumoreinzellen stehen von 19 Patienten beide Tumortypen (PT und DTC;  $n=47$ ) zur Verfügung. Dies ist entscheidend, da man nur so die genetische Ursache der Absiedelung der DTC (Metastasierung) genauer verifizieren kann.



#### 4. Ergebnisse

Bei den PT/DTC-Paaren (**Abbildung 22 B**) liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den Deletionen der PT und der DTC mit  $p=0.01$  vor (Mann-Whitney-U-Test;  $p$ -Wert two-tailed). Bei den Amplifikationen gibt es keinen. Zur genaueren Darstellung der Streuungsdaten der Aberrationen von PT und DTC wurde in **Abbildung 22 A** ein Boxplot Diagramm erstellt. Der Median (horizontale Linie innerhalb der Box) befindet sich nicht mittig, die Box ist daher unsymmetrisch und es liegt hier keine Normalverteilung der Werte vor.



**Abbildung 22: Chromosomale Veränderungen in den PT/DTC-Paaren**

**A:** Boxplot-Diagramm (Streuungsdiagramm) der PT und DTC der PT/DTC-Paare. Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50 % der Daten liegen. 1. Quartil (grün; 25 % der Datenwerte); 3. Quartil (lila; 75 % der Datenwerte); Median als horizontale Linie zwischen den beiden Boxen (50 % der Datenwerte); die Antennen zeigen die außerhalb der Box liegenden Werte an (die Länge der Antenne wird durch den maximalen und minimalen Wert festgelegt). **B:** Tabelle der Aberrationsmittelwerte.  $p$ -Wert Berechnung zwischen zwei Tumortypen mittels Mann-Whitney-U-Test;  $p$ -Wert two-tailed.

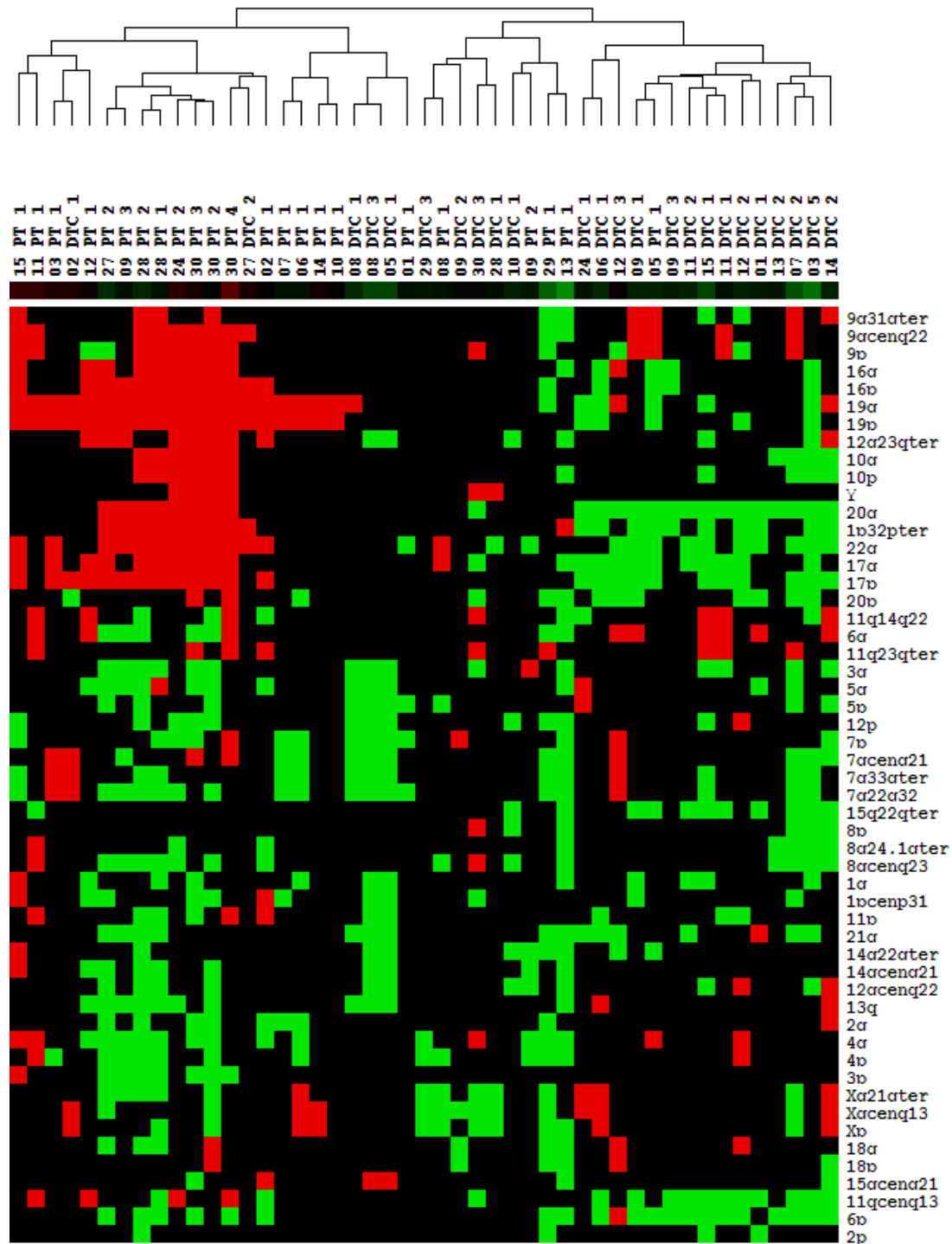
#### 4. Ergebnisse

---

Mit Hilfe der Ähnlichkeitsanalyse von den PT/DTC-Paare (**Abbildung 23**) zeigte sich, dass das Kollektiv sich hier auch in 2 große Äste bzw. Gruppen aufteilen lässt. Die Gruppe A besteht hier aus 18 PT und 5 DTC-Proben, also mehr PT-Proben als disseminierte Tumorzellen. In der Gruppe B ist dies genau umgekehrt der Fall (5 PT und 19 DTC). In der Vergrößerung des Dendrogrammes der PT/DTC-Paare (**Abbildung 24**) kann diese Gruppierung der beiden Tumorguppen noch genauer betrachtet werden. Bei 14 von 19 Patienten (74 %) liegen die PT-Proben in der einen Gruppe und die dazugehörige DTC-Proben in der anderen Gruppe. Wie zum Beispiel bei den Patienten 08, 11 und 30. Bei den Patienten 02, 13, 27 und 29, also bei nur 21 %, liegen beide Tumortypen gemeinsam in einer Gruppe. Bei nur einem Patient (09; 5,3 %) liegen alle drei DTC-Proben mit einer ihrer PT-Probe in derselben Gruppe (B), eine weitere PT-Probe liegt jedoch in Gruppe A.

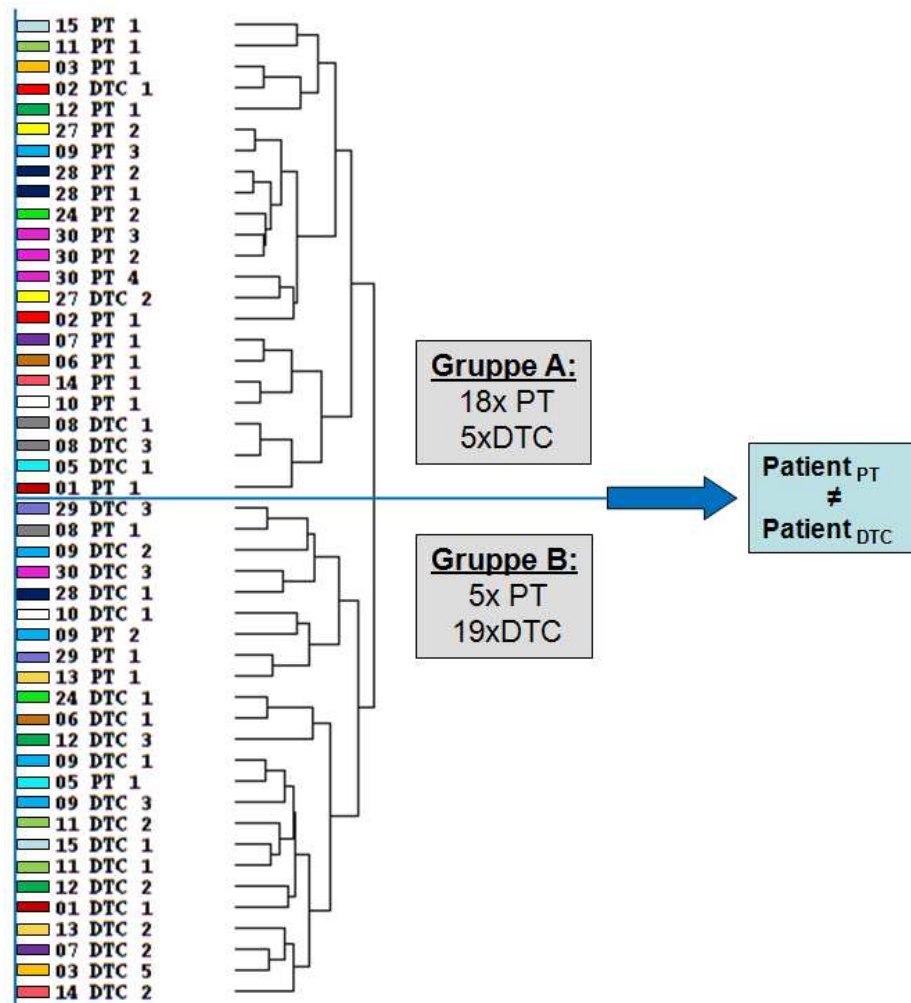
Durch diese hierarchische Clusteranalyse der PT/DTC-Paare zeigt sich, dass sich Primärtumore und disseminierte Tumorzellen vom selben Patienten in ihren chromosomalen Veränderungen deutlich unterscheiden. Die Primärtumore sind sich jedoch untereinander ähnlicher als zu ihren eigenen disseminierten Tumoreinzelzellen. Insgesamt kommt diese Ähnlichkeit der Primärtumore dadurch zustande, dass sie sich alle mehrere gleiche Deletionen auf denselben Chromosomenregionen teilen. In Gruppe A (23 Proben) haben die Proben zum Beispiel mehr Deletionen als Amplifikationen. Die Primärtumore aus Gruppe A (n=18) teilen häufig die Deletionen in den Chromosomen 1p32pter, 16, 17, 19, 20q und 22q, sowie die Amplifikation von 7q22q32. Die DTC der Gruppe B (n=19) teilen sich dagegen die Amplifikation von 1p32pter, 11qcenq13, 17, 20q und 22q (**Tabelle 12**). Durch diese Aufstellung der häufigsten aberranten Chromosomenregionen wurde deutlich, dass da wo die PT-Proben der Gruppe A Verluste (oder keine Veränderung) aufweisen, zeigen die DTC-Proben der Gruppe B dagegen einen Zugewinn. Es gab keine teilenden Aberrationen bei den PT und DTC. Die Deletion von Chromosomenregion 1p32pter und 19 gelten als besonders Artefakt anfällig und werden häufig falsch positiv als Verluste gewertet. Diese Aberrationen sind daher kritisch zu bewerten und flossen nur in Einzelfällen in die Auswertungen mit ein (s. dazu **Abschnitt 3.2.3**).

Zusammenfassend zeigten diese CGH Ergebnisse, dass sich die PT und die DTC auf genomischer Ebene zueinander nicht ähnlich sind.



**Abbildung 23: Hierarchische Cluster-Analyse der PT/DTC-Paare**

Cluster der PT/DTC-Paare mit 47 Proben (19 Patienten, complete linkage Methode). Oben die Proben mit den Verwandtschaftsverhältnisse als Dendrogramm; rechts die Chromosomenregionen (54-Banden-Einteilung); Grüne Kästchen = Amplifikationen; rote Kästchen = Deletionen.



**Abbildung 24: Dendrogramm der PT/DTC-Paare**

Links am Bildrand sind die einzelnen Proben der Patienten der PT/DTC-Paare (Patienten n=19; mit 47 Proben) aufgelistet. Die PT und DTC desselben Patienten haben gleiche Farbe. Danach folgt das dazugehörige Dendrogramm (complete linkage Methode), welches sich in zwei große Äste (Gruppe A und B) aufteilen lässt.

**Tabelle 12: Auffällige Chromosomenregionen in den Gruppen A (PT) und B (DTC) der PT/DTC-Paare**

Chromosomenregion	PT aus Gruppe A (n=18)		DTC aus Gruppe B (n=19)	
	Deletionen (%)	Amplifikationen (%)	Deletionen (%)	Amplifikationen (%)
1p32pter	44,4	0	0	47,4
4q	11,1	50	10,5	5,3
6p	0	33,3	5,3	57,9
6q	16,7	27,8	31,6	0
7q22q32	5,6	55,6	5,3	15,8
11qcenq13	22,2	11,1	0	63,2
15q22qter	0	5,6	0	47,4
16p	61,1	0	0	15,8
16q	50	0	5,3	15,8

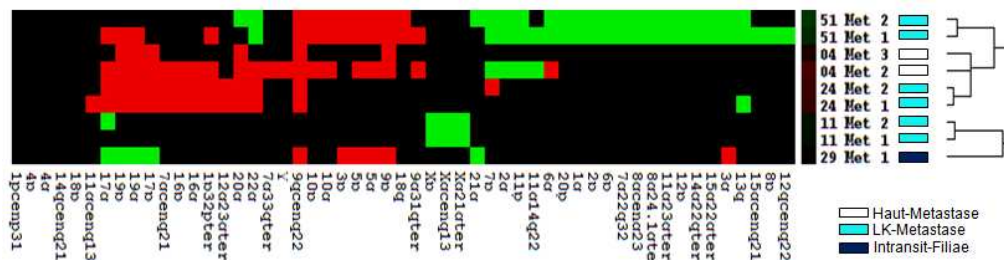
#### 4. Ergebnisse

Chromosomenregion	PT aus Gruppe A (n=18)		DTC aus Gruppe B (n=19)	
	Deletionen (%)	Amplifikationen (%)	Deletionen (%)	Amplifikationen (%)
17p	66,7	0	0	52,6
17q	55,6	0	0	57,9
19p	94,4	0	0	21,1
19q	94,4	0	10,5	21,1
20q	44,4	0	0	78,9
22q	61,1	5,6	0	52,6

Diese Tabelle zeigt die Häufigkeit für Chromosomenregionen an, die über die Hälfte der Proben ( $\geq 9$ ) aufweisen. Die Gonosomen wurden hier nicht mit einbezogen.

#### 4.2.3.2 Ähnlichkeitsanalyse der Metastasen

Bei der Verwandtschaftsanalyse der 9 Metastasen-Proben erkennt man, dass die Proben von einem Patienten immer zusammen liegen und sich daher untereinander genomisch sehr ähnlich sehen (**Abbildung 25**). In Hinblick auf ihre Organ-Herkunft (Haut, LK und Intransit-Filiae) kann man kein krankheitsrelevantes Muster erkennen.



**Abbildung 25: Hierarchische Cluster-Analyse der Metastasen Proben**

Cluster der 9 Metastasen Proben (average linkage Methode). Unten die Chromosomenregionen (54-Banden-Einteilung); rechts die Metastasen Proben mit dem Verwandtschaftsverhältnis als Dendrogramm; grüne Kästchen = Amplifikationen; rote Kästchen = Deletionen.

### 4.3 Molekulargenetische Charakterisierung der Onkogene B-RAF und N-RAS im malignem Melanom

Die zweite große Fragestellung in dieser Arbeit war, wie ähnlich sehen sich die PT und ihre DTC bezüglich des Mutationsvorkommen in den Onkogenen B-RAF und N-RAS. In der Literatur wird beschrieben, dass die Onkogene B-RAF und N-RAS beim malignen Melanom oft mutiert vorkommen. Um zu klären, ob in den vorhandenen Tumortypen auf Mutationsebene Gemeinsamkeiten auftreten, wurde anhand der SSCP-Methode ermittelt.

#### 4.3.1 SSCP-Etablierung für die Onkogene B-RAF und N-RAS

Die „single strand conformation polymorphism analysis“ (SSCP) ist eine Methode zum Auffinden von Mutationen innerhalb der vorgegebenen Sequenzabschnitte durch eine Konformationsänderung in der ssDNA und gewährleistete einen Überblick über das Mutationsvorkommen in den Proben. Für die SSCP-Gelelektrophorese der Onkogene B-RAF und N-RAS konnten erfolgreich spezifische Primer ermittelt werden. Hinzu konnten spezielle Faktoren für die SSCP dieser Onkogene gefunden werden, die für eine hohe Sensitivität und Laufverhalten der SSCP standen:

Es wurde jeweils ein 15 %iges PAA-Gel ohne Glycerol gewählt. Die Proben liefen erst 5 min bei 400 V und dann für 8 h bei 300 V. Alle Gele liefen mit konstanter Temperatur von 4 °C (im Kühlraum), da es sonst durch eine ungleichmäßige Wärmeverteilung im Gel zu einem „Banden-Smiling“ kam oder undeutliche Banden auftraten (**Abbildung 9** im **Abschnitt 3.3.3**).

#### Probenkollektiv für die SSCP-Analyse

In **Tabelle 13** sind jeweils die Proben, die für Auswertung des gesamten Probenkollektivs (A), der PT/DTC-Paare (B) und der PT-DTC-Met Triplets (C) auf Proben- und Patientenebene aufgelistet. Insgesamt konnten 89 % der N-RAS Proben und 98,2 % der B-RAF Proben mit der SSCP erfolgreich analysiert werden. Für die Auswertung der PT/DTC-Paare stehen hier insgesamt 28 Patienten mit 129 Proben zur Verfügung (in **Tabelle 40** im Anhang sind alle Proben-Ergebnisse der SSCP detailliert aufgelistet).

#### 4. Ergebnisse

**Tabelle 13:** Anzahl der durchgeführten SSCP-Proben für die Mutations Analyse B-RAF und N-RAS

A)

gesamtes Kollektiv	B-RAF					N-RAS				
	Proben	NA	Gesamt	Pat	NA	Proben	NA	Gesamt	Pat	NA
PT	61	3	64	35	0	51	13	64	30	5
DTC	122	1	123	41	0	117	6	123	40	1
Met	33	0	33	7	0	30	3	33	7	0
Summe	216	4	220	48	0	198	22	220	48	2
DTC pN0	96	1	97	33	0	91	5	96	33	0
DTC pN1	26	0	26	8	0	26	1	27	7	1

B)

PT/DTC-Paare	B-RAF					N-RAS				
	Proben	NA	Gesamt	Pat	NA	Proben	NA	Gesamt	Pat	NA
PT	48	2	50	28	0	41	9	50	25	3
DTC	78	1	79	28	0	74	5	79	27	1
Summe	126	3	129	28	0	115	14	129	24	4

C)

PT-DTC-Met Triplet	B-RAF					N-RAS				
	Proben	NA	Gesamt	Pat	NA	Proben	NA	Gesamt	Pat	NA
PT	10	0	10	4	0	7	3	10	3	1
DTC	12	1	13	4	0	12	1	13	4	0
Met	15	0	15	4	0	13	2	15	4	0
Summe	37	1	38	4	0	32	6	38	3	1

Anzahl der durchgeführten SSCP-Proben für **A:** die Auswertung des gesamten Kollektivs. **B:** die Auswertung der PT/DTC-Paare. **C:** die Auswertung der PT-DTC-Met Triplets. Angegeben sind die Anzahlen der Proben, die funktioniert haben, sowie die Ausfälle (NA) auf Proben- und Patientenebene (Pat).

#### Methodische Schwierigkeiten

Bei 11 % der N-RAS Proben und bei nur 1,8 % der B-RAF Proben war keine Auswertung der Sequenz möglich. Hier konnte keine spezifische PCR (B-RAF bzw. N-RAS) gemacht werden. Grund dafür könnte eine schlechte Template-DNA sein. Dies spricht dafür, weil hauptsächlich die PT betroffen waren (Paraffin-fixierte Gewebeschnitte). Die Paraffinschnitte, die für diese Untersuchungen zur Verfügung standen, wurden zwischen den Jahren 2003 und 2005 angefertigt. Wenn Schnitte, die genomische DNA enthalten, nicht sachgerecht, oder über lange Zeiträume gelagert werden, so kann eine Fragmentierung der DNA eintreten, sei es durch physikalische oder durch chemische Einflüsse (DNAsen oder Feuchtigkeit). Somit liegt der oft schwierige Verlauf der PCRs auch im Alter der Proben begründet. Sowie unterschiedliche Protokolle bzw. Inhaltsstoffe und Verunreinigungen (z.B. Phenole) können

## 4. Ergebnisse

---

als Inhibitoren der PCR bzw. DNA-abbauende Substanzen (DNAsen, Radikale) zum Ausfall eines spezifischen Amplifikationsproduktes führen.

### 4.3.1.1 SSCP für das Onkogen B-RAF

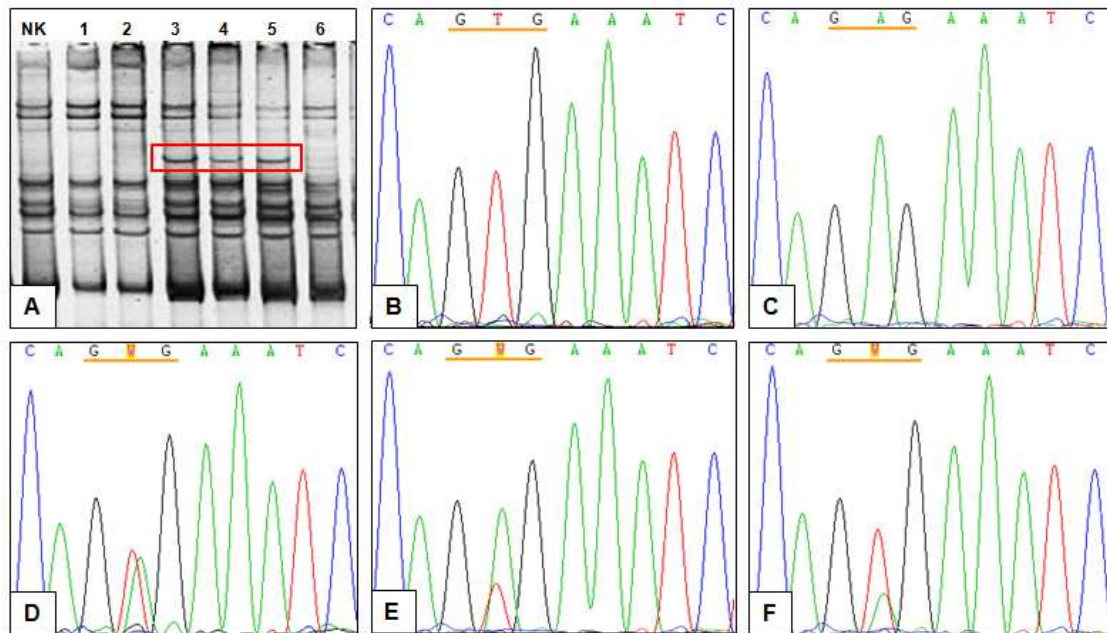
Es konnten unterschiedliche Bandenmuster im SSCP-Gel für das B-RAF Gen gefunden werden (**Abbildung 26 A, Abbildung 27 A/B und Abbildung 28 A**).

Das Bandenmuster in **Abbildung 26 A** kam in diesem Proben-Kollektiv am häufigsten vor. In den Spuren 3, 4 und 5 ist eine zusätzliche Bande in der Mitte des Gels vorhanden. In den Spuren 1, 2 und 6 dagegen nicht. Durch die Auswertung dieser Proben durch das Sequenzieren nach Sanger und das so entstandene Chromatogramm konnte festgestellt werden, dass diese Proben ohne zusätzliche Bande, das B-RAF Wildtyp-Triplett (GTG; **Abbildung 26 B**) aufwiesen. Bei den Proben mit der zusätzlichen Bande, wurde in allen Fällen erfolgreich die B-RAF Mutation p.V600E<sup>4</sup> (c.1799T>A) detektiert. In den erhaltenden Chromatogramm-Sequenzen waren an der Position 600 des B-RAF Gens bei den meisten Proben zwei gleichhohe Peaks (W) von T und A zu erkennen (**Abbildung 26 D**; W=A oder T; c.1799T>W). Dies bedeutet einen heterozygoten Einzelnukleotid Polymorphismus (SNP engl. *Single Nucleotide Polymorphism*). Das eine Allel trägt demnach die Wildtyp Base T und das andere Allel die Punktmutation A. Es gab auch Proben, wo der Peak von T etwas mehr dominierte oder der Peak von A. Da die Hintergrund Peaks in allen Sequenzen sehr gering und der Abstand der einzelnen Peaks zueinander gleichmäßig waren (**Abbildung 26 E und F**), wurden diese Fälle hier auch vom Programm als heterozygote Mutation (Mischbase W) gewertet.

---

<sup>4</sup> B-RAF p.V600E; c.1799T>A; COSMIC-ID: COSM476





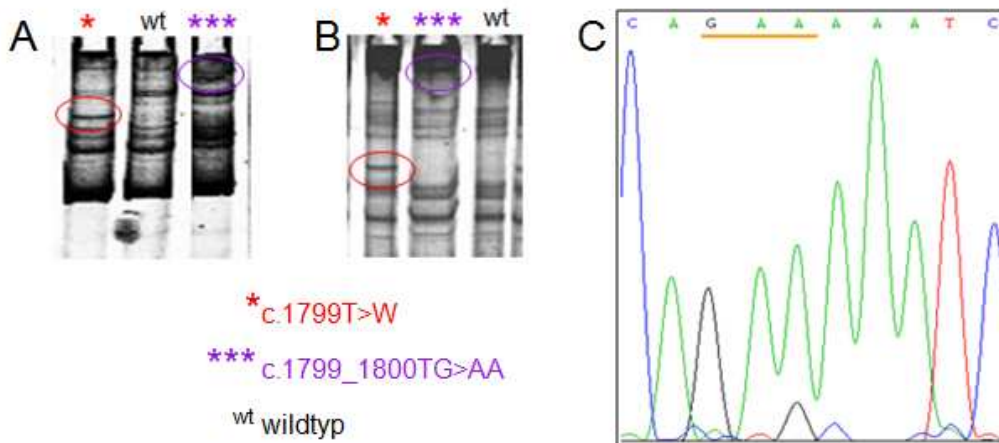
**Abbildung 26: SSCP-Gel und Sequenz-Chromatogramm für das Onkogen B-Raf**

**A:** B-Raf SSCP-Gel. In den Spuren 3, 4 und 5 ist eine zusätzliche Bande erkennbar, die der p.V600E Mutation entspricht. In den Spuren 1, 2 und 6 ist der Wildtyp vorhanden. NK steht für negative Kontrolle. **B:** Chromatogramm mit der Sequenz vom Wildtyp B-Raf (GTG). **C:** Chromatogramm mit der Sequenz für die B-Raf Mutation c.1799T>A welche zu p.V600E führt (homozygot). **D:** Chromatogramm mit der Mischbase W (c.1799T>W). Hier zwei gleichhohe Peaks an der Position 600 des B-Raf Gens (heterozygot). **E:** Chromatogramm mit der Mischbase W. Hier dominiert der Peak von A mehr als der von T an der Position 600. **F:** Chromatogramm mit der Mischbase W. Hier dominiert der Peak von T mehr als der von A an der Position 600. Unterstrichen jeweils das Triplet für die Aminosäure; W steht für die Base A oder T.

In 2 Proben konnte mittels der SSCP und der Sequenzierung zusätzlich die komplexe Substitution c.1799\_1800TG>AA (homozygot) gefunden werden. Diese Form verursachte im SSCP-Gel ein anderes Bandenmuster (**Abbildung 27**; als p.V600E\*<sup>5</sup> markiert). Da diese Substitutionen jedoch auch zu B-Raf p.V600E Mutation führen, wurden die zwei Proben daher mit den anderen p.V600E positiven Proben für die Auswertung zusammen addiert. Zudem konnte noch die komplexe Substitution c.1798\_1799GT>RW (heterozygot) gefunden werden. Diese führt zu der seltenen B-Raf Mutation p.V600K<sup>6</sup>. Auch diese Mutationsform zeigte ein anderes Bandenmuster im SSCP-Gel (**Abbildung 28**). Diese Mutation kam nur in einer PT-Probe (35 PT 01) vor.

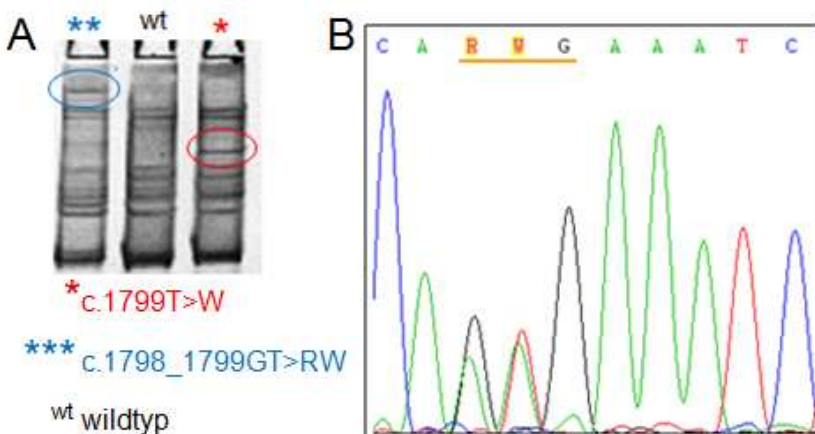
<sup>5</sup> B-Raf p.V600E\*; c.1799\_1800TG>AA; COSMIC-ID: COSM475

<sup>6</sup> B-Raf p.V600K; c.1798\_1799GT>AA; COSMIC-ID: COSM473



**Abbildung 27: SSCP-Gel und Sequenz-Chromatogramm von B-Raf p.V600E\***

Bandenmuster der komplexen Substitution c.1798\_1799GT>AA (homozygot; COSM475). **A:** bei der Probe 28 DTC 03. **B:** bei der Probe 28 PT 01. **C:** Chromatogramm der p.V600E\*.



**Abbildung 28: SSCP-Gel und Sequenz-Chromatogramm von B-Raf p.V600K**

**A:** Bandenmuster der komplexen Substitution c.1798\_1799GT>RW (heterozygot; COSM473). **B:** Chromatogramm der Probe 35 PT 01.

Die B-Raf Mutation p.V600E kam in diesem Patientenkollektiv mit 80,6 % (25 von 31 positiven) heterozygot vor. In 16,1 % der Fälle wurde eine homozygote Substitution detektiert (**Abbildung 26 C**). Die p.V600K kam nur mit 3,2 % vor. Mittels dieser SSCP-Methode konnte bestätigt werden, dass durch ein verändertes spezifisches Bandenmuster im SSCP-Gel ein sicherer Indikator für eine Mutation im B-Raf Gen ist. Aus diesem Grund wurden alle Proben mit auffälligem Bandenmuster als B-Raf mutiert angesehen.

Zur Bestätigung dieser Annahme wurden die Proben zusätzlich sequenziert. Dabei kam es zu einer 100 % Übereinstimmung der Ergebnisse (**Tabelle 14**). Nur im SSCP-Gel konnte keine Trennung zwischen der heterozygoten und der homozygoten p.V600E Mutation gemacht

#### 4. Ergebnisse

werden. Beide zeigten das gleiche Bandenmuster. Nur die B-RAF Mutationen p.V600E\* und p.V600K wiesen ein „anderes“ Bandenmuster im SSCP-Gel auf (**Tabelle 14**).

**Tabelle 14:** Vergleich der B-RAF Ergebnisse von SSCP und Sequenzierung

Tumortyp	Sequenzierung		SSCP-Bandenmuster		
	B-RAF	Anzahl	p.V600E	wildtyp	"anders"
PT	heterozygot	15	15	0	0
	homozygot	2	2	0	0
	c.1798_1799GT>RW (p.V600K)	1	0	0	1
	c.1798_1799GT>AA (p.V600E)	1	0	0	1
	wildtyp	32	0	41	0
	<b>Summe</b>	<b>51</b>	<b>61</b>		
DTC	heterozygot	4	4	0	0
	homozygot	0	0	0	0
	c.1798_1799GT>RW (p.V600K)	0	0	0	0
	c.1798_1799GT>AA (p.V600E)	1	0	0	1
	wildtyp	112	0	117	0
	<b>Summe</b>	<b>117</b>	<b>122</b>		
Met	heterozygot	6	6	0	0
	homozygot	1	1	0	0
	c.1798_1799GT>RW (p.V600K)	0	0	0	0
	c.1798_1799GT>AA (p.V600E)	0	0	0	0
	wildtyp	26	0	26	0
	<b>Summe</b>	<b>33</b>	<b>33</b>		

##### 4.3.1.2 SSCP für das Onkogen N-RAS

#### Codon 61

Für das SSCP-Gel von N-RAS Codon 61 konnten die spezifischen Laufbedingungen von B-RAF übernommen werden. Insgesamt wurden fünf unterschiedliche Bandenmuster gefunden (siehe \* in **Abbildung 29 A**). Diese Proben wurden sequenziert und per Chromatogramm-Auswertung erhielt man je Bandenmuster eine andere N-RAS Sequenz. Das Bandenmuster in den Spuren 1, 5 und 6 in **Abbildung 29 A** gibt die Wildtyp Sequenz von Codon 61 wieder. Das Bandenmuster in den anderen Spuren wies auf eine Mutation im Codon 61 hin.

In dem hier untersuchten Proben-Kollektiv wurden folgende N-RAS Mutationen im Codon 61 gefunden:

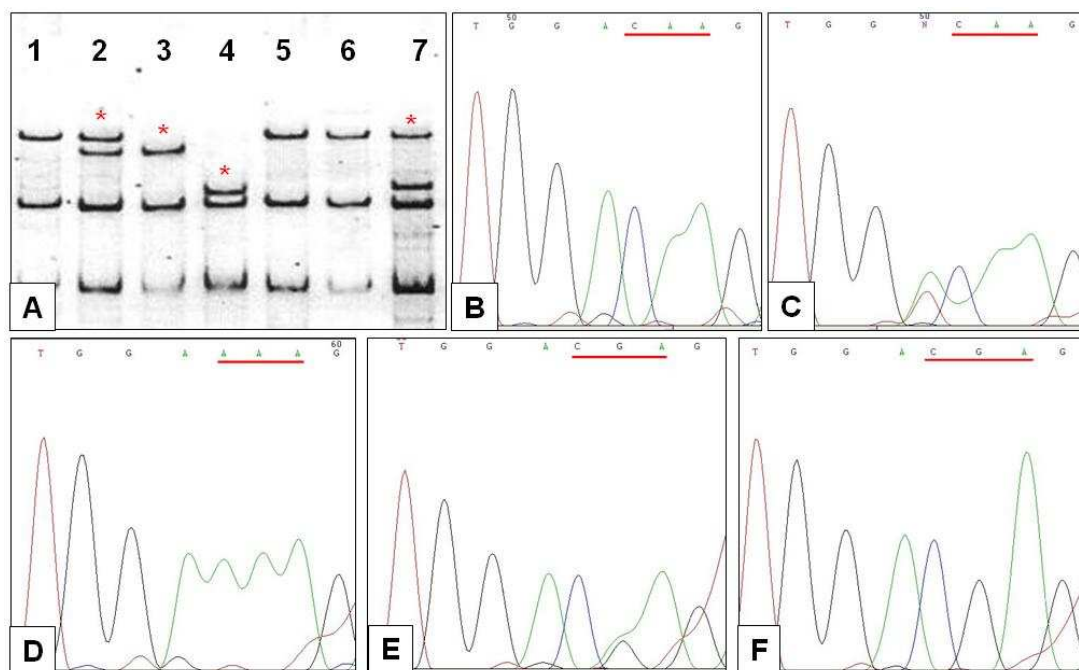
- p.Q61R<sup>7</sup>: An der Position 182 kam es zu einer Substitution von Glutamin zu Arginin (c.182A>G, homozygot) durch den Basenaustausch von A zu G (**Abbildung 29 F**). Auch

<sup>7</sup> N-RAS p.Q61R; c.182A>G; COSMIC-ID: COSM584

#### 4. Ergebnisse

die heterozygote Substitution c.182A>R (R=A oder G) wurde gefunden. Da diese im SSCP-Gel ein anderes Bandenmuster als die homozygote Mutation aufwies, ist sie hier als p.Q61R\* markiert (**Abbildung 29 E; Tabelle 15**). Die Mutationen p.Q61R und p.Q61R\* wurden für die weiteren Auswertungen als p.Q61R zusammengefasst.

- p.Q61K<sup>8</sup>: An der Position 181 kam es zu einer Substitution von Glutamin zu Lysin (c.181C>A, homozygot) durch den Basenaustausch von C zu A (**Abbildung 29 D**).
- Stille Mutation p.G60G: An der Position 180 wurde eine heterozygote Mutation gefunden c.180A>N (N=A oder T; **Abbildung 29 C**). Hier handelt es sich jedoch um eine sogenannte „stille Mutation“, da sie keine Auswirkung auf das resultierende N-RAS Protein hat. Sie wird hier kurz erwähnt, da sie auch zu einer Konformationsänderung im Gel geführt hat (**Abbildung 29 A**). Sie wurde insgesamt bei den PT 5-mal und bei den DTC sogar 24-mal detektiert (in der Literatur ist über diese stille Mutation nichts beschrieben worden).



**Abbildung 29: SSCP-Gel und Sequenz-Chromatogramm von N-RAS (Codon 61)**

**A:** SSCP-Gel mit unterschiedlichen Bandenmuster für N-RAS Codon 61. In den Spuren 1, 5 und 6 ist der Wildtyp sichtbar. In der Spur 2 ist die Mutation p.Q61R, in der Spur 3 p.Q61R\*, in der Spur 4 p.Q61K und in der Spur 7 die stille Mutation. **B:** Chromatogramm vom Wildtyp N-RAS. **C:** Chromatogramm von der stillen Mutation p.G60G. **D:** Chromatogramm der Mutation p.Q61K. **E:** Chromatogramm des heterozygoten SNPs p.Q61R\*. **F:** Chromatogramm der Mutation p.Q61R (homozygot). Unterstrichen jeweils das Triplet für die Aminosäure; N steht für die Base Adenin oder Thymin.

<sup>8</sup> N-RAS p.Q61K; c.181C>A; COSMIC-ID: COSM580

#### 4. Ergebnisse

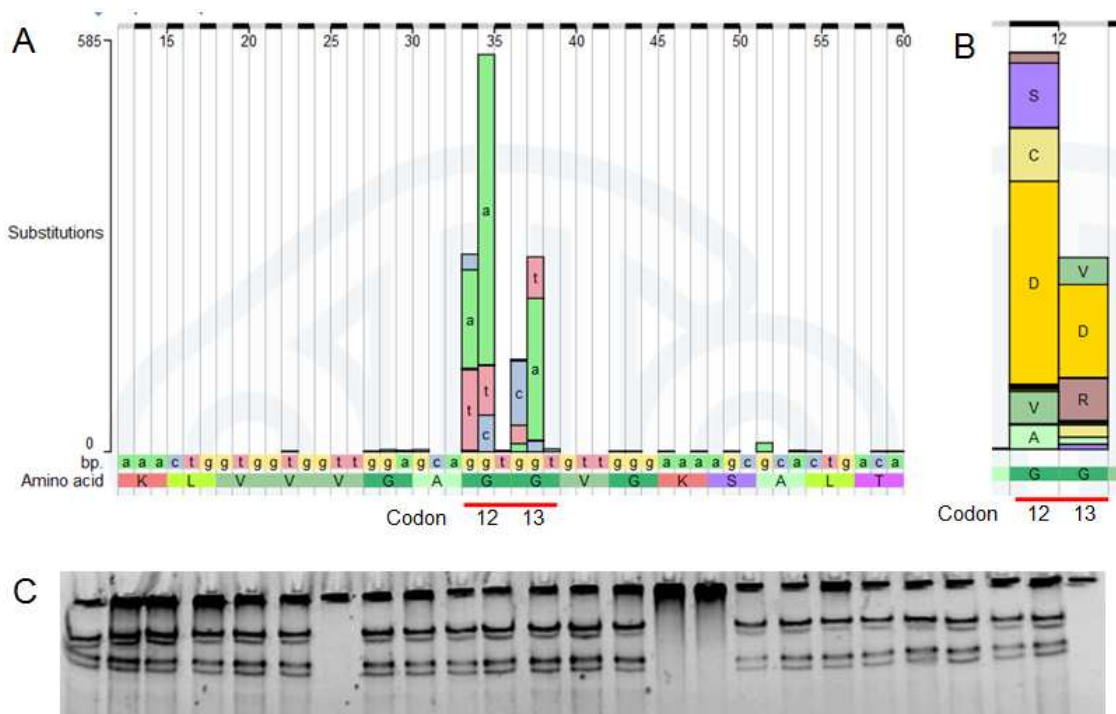
**Tabelle 15: Vergleich der N-RAS Ergebnisse von SSCP und Sequenzierung**

Tumortyp	Sequenzierung		SSCP-Bandenmuster		
	N-RAS	Anzahl	"spezifisch"	wildtyp	"anders"
PT	p.Q61R homozygot	1	1	0	0
	p.Q61R heterozygot	2	2	0	0
	p.Q61K	1	1	0	0
	wildtyp	29	0	41	1
	wildtyp + p.G60G	5	4	1	0
	<b>Summe</b>	<b>38</b>	<b>51</b>		
DTC	p.Q61R homozygot	2	2	0	0
	p.Q61R heterozygot	2	2	0	0
	p.Q61K	6	6	0	0
	wildtyp	25	0	82	1
	wildtyp + p.G60G	24	20	4	0
	<b>Summe</b>	<b>59</b>	<b>117</b>		
Met	p.Q61R homozygot	0	0	0	0
	p.Q61R heterozygot	0	0	0	0
	p.Q61K	0	0	0	0
	wildtyp	30	0	30	0
	wildtyp + p.G60G	0	0	0	0
	<b>Summe</b>	<b>30</b>	<b>30</b>		

#### Codon12/13

In dem SSCP-Gel von N-RAS Codon 12/13 konnte, trotz verschiedener getesteter Laufbedingungen, kein abweichendes Bandenmuster für eine der bekannten Mutationen dieses Codons nachgewiesen werden. Alle Proben zeigten immer dasselbe Bandenmuster (**Abbildung 30 C**). Nach Sequenzierung von einigen Proben, erhielt man die Wildtyp-Sequenz des Codons 12/13. Für dieses Codon sind jedoch sehr viele verschiedene Mutationen für das Melanom beschrieben (**Abbildung 30 A und B**). Zudem konnte für dieses Codon zum damaligen Zeitpunkt keine Zelllinie mit den dort am häufigsten auftretenden Mutationen p.G12D (c.35G>A) und p.G13D (c.38G>A) als positiv Kontrolle beschafft werden. Da es nicht unbedingt zu einer Konformationsänderung der ssDNA mit einer Mutation kommen muss, müsste man hier für die Detektierung der N-RAS Mutationen im Codon 12/13 eine komplette Proben Sequenzierung durchführen. Dies wurde aus Kostengründen in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Die Mutation p.Q61R und p.Q61K sind die in der Literatur am häufigsten beschriebenen N-RAS Mutationen im Melanom. Somit stellt die N-RAS SSCP-Analyse zumindest für das Codon 61 eine sichere Mutationsanalyse dar.



**Abbildung 30. N-RAS Codon 12/13**

**A:** COSMIC-Auszug vom N-RAS Gen Codon 12/13 von Trust Sanger Institute (2014). Darstellung der häufigsten Basensubstitutionen in der cDNA; Position 34-39. **B:** Vergrößerung der häufigsten Aminosäuren-Substitutionen für Codon 12/13. **C:** SSCP-Gel von N-RAS Codon 12/13; ohne Kontrollen.

### 4.3.2 Mutationsvorkommen der Onkogene B-RAF und N-RAS

Bei den PT konnte in 31 % der Proben eine B-RAF Mutation (p.V600E oder p.V600K) detektiert werden (**Tabelle 16 A**). Die B-RAF Mutation fand sich in den DTC deutlich seltener (4 % B-RAF p.V600E). Zwischen PT und DTC herrscht ein markanter Unterschied von  $p \leq 0.001$  (Fisher Exakt Test;  $p = \text{two-tailed}$ ). Folglich wiesen insgesamt 37 % der untersuchten Patienten eine B-RAF Mutation in ihren Primärtumoren auf. Im Vergleich dazu haben nur 10 % der Patienten eine B-RAF Mutation in ihren DTC. Der Unterschied des Mutationsvorkommens zwischen PT und DTC beträgt daher auch auf Patientenebene einen Unterschied von  $p < 0.05$  (Fisher Exakt Test;  $p = \text{two-tailed}$ ).

Bei der Mutationsanalyse von N-RAS (Codon 61) konnte bei 8 % der PT eine N-RAS Mutation (p.Q61R oder p.Q61K) identifiziert werden (**Tabelle 16 B**). Die Mutation p.Q61R war 3-mal vorhanden und die p.Q61K nur einmal. Somit haben insgesamt nur 13 % der untersuchten Patienten eine N-RAS Mutation im Primärtumor. In den DTC konnte in 9 % der Proben eine der N-RAS Mutationen (p.Q61R und p.Q61K) gefunden werden (22,5 % der Patienten positiv

#### 4. Ergebnisse

für N-RAS). Das Mutationsvorkommen für N-RAS zeigt zwischen den PT-Proben und den DTC-Proben einen Unterschied von  $p=1$  auf (Fisher Exakt Test;  $p$ =two-tailed).

**Tabelle 16: Ergebnisse von B-RAF und N-RAS im gesamten Kollektiv**

A) B-RAF	Proben			Patienten		
	mt	wt	Gesamt	pos	neg	Gesamt
PT	19 31 %	42 69 %	61	13 37 %	22 63 %	35
DTC	5 4 %	117 96 %	122	4 10 %	37 90 %	41
Met	7 21 %	26 79 %	33	5 72 %	2 28 %	7
Summe	31 14 %	185 86 %	216	---	---	48
p-Wert PT vs. DTC	<b>p&lt;0.001</b>			<b>p&lt;0.01</b>		
DTC pN0	1 1 %	95 99 %	96	1 3 %	32 97 %	33
DTC pN1	4 15 %	22 85 %	26	3 37,5 %	5 62,5 %	8
p-Wert pN0 vs. pN1	<b>p&lt;0.01</b>					

B) N-RAS	Proben			Patienten		
	mt	wt	Gesamt	pos	neg	Gesamt
PT	4 8 %	47 92 %	51	4 13 %	26 87 %	30
DTC	10 9 %	107 91 %	117	9 22,5 %	31 77,5 %	40
Met	0 0 %	30 100 %	30	0 0 %	7 100 %	7
Summe	14 7 %	184 93 %	198	---	---	48
p-Wert PT vs. DTC	<b>p=1</b>			<b>p=0.37</b>		
DTC pN0	9 10 %	82 90 %	91	8 24 %	25 76 %	33
DTC pN1	1 4 %	25 96 %	26	1 14 %	6 86 %	7
p-Wert pN0 vs. pN1	<b>p=0.45</b>			<b>p=0.67</b>		

**A:** Mutationsvorkommen von den B-RAF Mutationen (mt) und dem B-RAF Wildtyp (wt) in den PT, DTC und Met auf Proben- und Patientenebene des gesamten Kollektiv. **B:** Vorkommen der N-RAS Mutationen im Codon 61 (mt) und des Wildtyps (wt) in den PT, DTC und Met auf Proben- und Patientenebene des gesamten Kollektivs. Ein Patient ist positiv, wenn eine Probe mutiert ist. ( $p$ -Wert mittels Vierfeldertest; Fishers Exakt Test;  $p$ -Wert two-tailed).

Die Metastasen-Proben kamen aus verschiedenen Organen, wie Haut, Lymphknoten, Lunge und Intransit-Filiale der Haut. Die B-RAF spezifische PCR hat bei allen 33 Metastasen-Arealen funktioniert und es konnten 7 positive B-RAF Mutationen (21 %) detektiert werden. Trotz der geringen Anzahl von Patienten mit Metastasen, waren 71 % der Patienten B-RAF (p.V600E)



#### 4. Ergebnisse

positiv. Die N-RAS spezifische PCR hat dagegen nur in 91 % der Proben funktioniert. In keiner Metastasen-Probe konnte eine N-RAS Mutation gefunden werden (**Tabelle 17**).

**Tabelle 17:** *B-RAF- und N-RAS-Mutationen in den Metastasen-Proben*

Probenanzahl Met	B-RAF (n=33)	N-RAS (n=30)
LK-Metastase	4 / 19 21 %	0 / 17
Lungen-Metastase	0 / 2	0 / 2
Intransit-Filiae Haut	1 / 4 25 %	0 / 4
Haut-Metastasen	2 / 8 25 %	0 / 8
Total	7 / 33 22,6 %	0 / 30

#### **DTC pN0 versus DTC pN1**

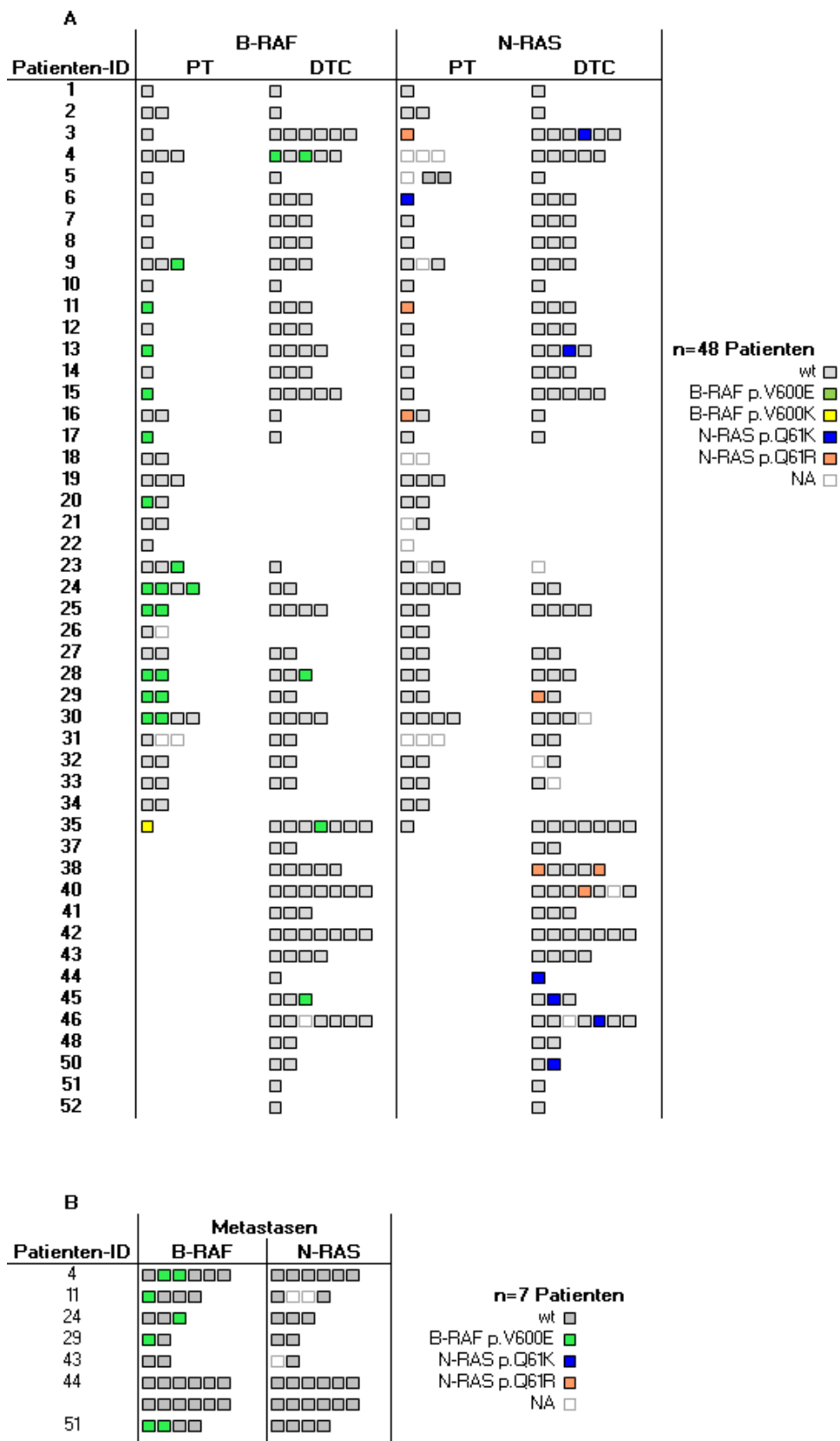
Bei der Betrachtung der DTC-Proben aus pN0 und pN1, wiesen die DTC aus dem pN0-SLN knapp mehr N-RAS Mutationen auf (10 %), als die DTC-Proben aus dem pN1-SLN (4 %). Der Unterschied beträgt hier  $p=0.45$  (Fisher Exakt Test; p-Wert two-tailed). Die meisten DTC-Proben, die B-RAF mutiert sind (15 %) kamen bei den histopathologisch positiven (pN1) DTC vor. Nur 1 % der DTC Proben aus dem pN0-SLN sind positiv. Hier beträgt der statistische Unterschied  $p<0.01$  (Fisher Exakt Test; p-Wert two-tailed; **Tabelle 16**).

#### **Heterogenität**

Ein weiteres Augenmerk lag hier auch auf der Heterogenität der einzelnen Tumortypen. Bei den Primärtumoren und Metastasen konnten mehrere Areale gelasert werden. Bei einem Vergleich der Areale eines Patienten stellte sich heraus, dass in einem gelaserten Areal (Probe) eine Mutation liegen kann und in dem nächsten Areal nicht. So liegt in den Arealen der Primärtumoren eine Heterogenität für die Onkogene B-RAF und N-RAS vor (**Abbildung 31 A**). Sowie auch bei den Arealen der Metastasen (**Abbildung 31 B**).



4. Ergebnisse



**Abbildung 31: Heterogenität und Mutationsvorkommen von B-RAF und N-RAS.**  
A: in den PT- und DTC-Proben B: in den Metastasen-Proben. Ein Kästchen entspricht einer Probe; wt=wildtyp; NA=nicht auswertbar.

### 4.3.3 Mutationsvorkommen in den PT/DTC-Paaren

Bei der Auswertung der PT/DTC-Paare (28 Patienten mit PT und DTC; **Tabelle 18**) für B-RAF und N-RAS haben die untersuchten Primärtumoren in 37,5 % der Fälle eine B-RAF Mutation (nur p.V600E) und in 10 % eine N-RAS Mutation. In den DTC sind es nur 5 % für B-RAF und 5 % für N-RAS. Daher liegt bei den Patienten für das Onkogen B-RAF ein statistischer Unterschied von  $p=0.01$  vor (zwischen den Proben  $p<0.001$ ; Fisher Exakt Test;  $p$ -Wert two-tailed).

**Tabelle 18:** Ergebnisse von B-RAF und N-RAS in den PT/DTC-Paaren.

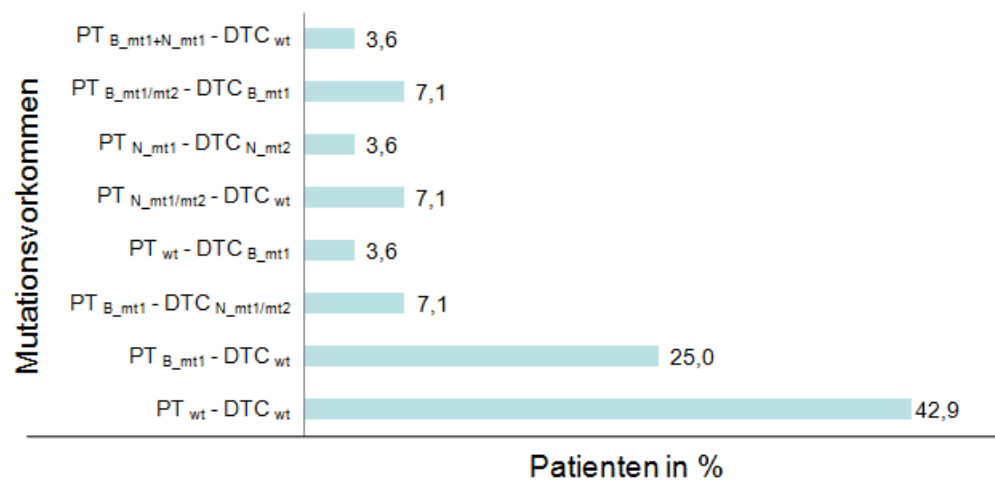
B-RAF / N-RAS		Proben			Patienten		
		mt	wt	Gesamt	pos	neg	Gesamt
PT	B-RAF	18 37,5 %	30 62,5 %	48	12 43 %	16 57 %	28
	N-RAS	4 10 %	35 90 %	39	4 17 %	20 83 %	24
DTC	B-RAF	4 5 %	74 95 %	78	3 11 %	25 89 %	28
	N-RAS	3 5 %	63 95 %	66	3 12,5 %	21 87,5 %	24
B-RAF Summe		22	104	126	---	---	28
p-Wert PT vs. DTC		$p<0.001$			$p=0.01$		
N-RAS Summe		7	98	105	---	---	24
p-Wert PT vs. DTC		$p=0.42$			$p=1$		

Auftreten der N-RAS Mutation (mt) und des Wildtyps (wt) in den PT- und DTC-Proben auf Proben- und Patientenebene der PT/DTC-Paare. Ein Patient ist positiv, wenn eine Probe mutiert ist ( $p$ -Wert mittels Vierfeldertest; Fisher Exakt Test;  $p$ -Wert two-tailed).

An dem prozentualen Mutationsvorkommen erkennt man, dass insgesamt die B-RAF Mutation p.V600E am meisten in den Primärtumoren (37,5 %) und in den Metastasen (72 %) vorkommen. Die N-RAS Mutationen kommen insgesamt seltener vor. Demzufolge zeigen die Primärtumore eines Patienten eine höhere Mutationsrate in den Onkogenen als ihre DTC. Bei der Betrachtung der Proben von gleichen Patienten (Progression) wurde deutlich, dass bei 42,9 % der Patienten beide Tumortypen (PT und DTC) in der Wildtyp-Form (wt) vorliegen (**Abbildung 32; Tabelle 41** im Anhang). Danach folgen mit 25 % die Patienten, bei denen der Primärtumor B-RAF (p.V600E) mutiert ist und die DTC die Wildtyp-Form zeigen. Nur 7,1 % der Patienten haben sowohl im PT als auch in dessen DTC eine B-RAF Mutation (PT<sub>B\_mt1/mt2</sub> – DTC<sub>B\_mt1</sub>). Von den 16 mutierten Patienten haben 2 Patienten in beiden Tumortypen eine B-RAF Mutation und 1 Patient in beiden eine N-RAS Mutation (insgesamt 18,8 % gleich verändert;

#### 4. Ergebnisse

**Abbildung 31 A).** Dies bedeutet, dass eine Divergenz von 81,2 % zwischen Primärtumor und disseminierten Tumoreinzelzellen besteht, keine Punktmutationen zu teilen.



**Abbildung 32: Mutationsvorkommen für PT und DTC in den PT/DTC-Paaren.**

*B\_mt1=B-RAF p.V600E; B\_mt2=B-RAF p.V600K; N\_mt1=N-RAS p.Q61R; N\_mt2=N-RAS p.Q61; mt1/mt2=Mutation 1 oder 2; mt1+mt2=Mutation 1 und 2; wt=wildtyp; n=28 Patienten.*

#### 4.4 Quantifizierung von Cyclin D1 in den disseminierten Tumor Einzelzellen

Mit Hilfe der CGH-Analyse konnte das Vorkommen von mehreren abweichenden Chromosomenregionen zwischen DTC und PT ermittelt werden. Da die DTC im Vergleich zu den PT insgesamt weniger Aberrationen aufwiesen, sowie auch weniger B-RAF- und N-RAS-Mutationen, wurden hier nur die DTC mittels qPCR genauer untersucht.

##### 4.4.1 Zielgen und Referenzgene

Es wurde eine Chromosomenregion gesucht, die in den meisten DTC Proben amplifiziert vorkam, aber nicht bei den Primärtumoren. Aus diesem Grund wurden hier speziell nur die Genregionen der Protagonisten des MAPK-Signaltransduktionsweges (RAS-Familie, RAF-Familie ERK und MEK, etc.), familiärer Melanome (MC1R), bekannte Onkogene (p53, p16) und des PI3K-AKT-Signaltransduktionsweges (PTEN) betrachtet (**Tabelle 19**).

Anhand dieser Aufstellung der CGH-Profile der DTC erkennt man, dass es kaum Deletionen in diesen Chromosomenregionen gibt, jedoch vermehrt Amplifikationen. Die Primärtumore zeigen insgesamt mehr Deletionen in diesen Chromosomen-Regionen. Der auffälligste Unterschied in dieser Aufstellung ist die der Chromosomenregion 11q13. In dieser Region wurde in 45,9 % der DTC Proben ein Zugewinn gefunden (**Abbildung 33**).

**Tabelle 19:** Anzahl der Deletionen und Amplifikationen der DTC- und PT-Proben in speziellen Chromosomenregionen

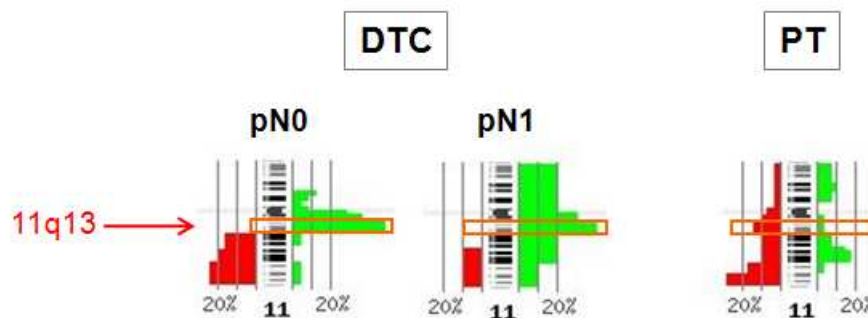
Chromosomen Region der CGH	DTC (n=37)		PT (n=28)		Genbereich von	
	Deletion (%)	Amplifikation (%)	Deletion (%)	Amplifikation (%)		
1p13	0,0	16,2	3,6	3,6	N-RAS	1p13.2
3p25	0,0	0,0	3,6	0,0	RAF1 (C-RAF)	3p25.2
4q12	0,0	2,7	3,6	28,6	KIT	4q12
7q34	5,4	18,9	3,6	32,1	B-RAF	7q34
9p21	5,4	18,9	25,0	3,6	CDKN2A (p16(INK4))	9p21.3
10q23	0,0	13,5	21,4	3,6	PTEN	10q23.31
11q13	0,0	45,9	14,3	3,6	CCND1	11q13.3
11q14	10,8	8,1	10,7	7,1	H-RAS	11q15.5
12p12	2,7	10,8	0,0	32,1	K-RAS	12p12.1
12q14	2,7	16,2	3,6	3,6	CDK4	12q14.1
14q32	0,0	5,4	3,6	10,7	AKT1	14q32.2
15q22	0,0	16,2	0,0	3,6	MEK1 (MAP2K1)	15q22.31

#### 4. Ergebnisse

Chromosomen Region der CGH	DTC (n=37)		PT (n=28)		Genbereich von	
	Deletion (%)	Amplifikation (%)	Deletion (%)	Amplifikation (%)		
16p11.2	2,7	13,5	39,3	3,6	ERK1 (MAPK3)	16p11.2
16q24	2,7	8,1	21,4	3,6	MC1R	16q24.3
17p13	2,7	40,5	42,9	3,6	p53	17p13.1
19p13.3	13,5	27,0	64,3	3,6	MEK2 (MAP2K2)	19p13.3
19q13.2	18,9	24,3	53,6	3,6	AKT2	19q13.2
22q11.2	2,7	24,3	42,9	7,1	ERK2 (MAPK1)	22q11.21

Farblich hervorgehoben sind die mit über 25 % vorkommen; Deletionen (rot) und Amplifikation (grün); grau hinterlegt CCND1 (Cyclin D1).

Die Region von 11q13 umspannt fast 14 Mb und enthält mehr als 200 Gene. In dieser Region liegt das bekannte Cyclin D1-Gen (11q13.3, Länge von 13.369 bp mit 5 Exons), was in der Literatur als ein wichtiges Gen für den MAPK-Signaltransduktionsweg beschrieben ist und beim malignen Melanom oft amplifiziert vorliegt.



**Abbildung 33: CGH-Ideogramm der Chromosomenregion 11q13**  
Chromosomen-Ausschnitt aus den Ideogramm Profilen (s. Anhang 10.3.1)

Zur quantitativen Analyse der disseminierten Tumoreinzelzellen des malignen Melanoms wurde daher das Cyclin D1 als Zielgen verwendet. Als Referenzgene wurden 6 Gene aus dem qPCR-Bestand der Arbeitsgruppe Klein ausgesucht. Diese dürften so wenig wie möglich Deletionen (oder Amplifikationen) in den Genbereichen der DTC-Proben aufweisen. In **Tabelle 20** sind die ausgewählten Referenzgene mit den wenigsten Aberrationen in den DTC-Proben aufgelistet.

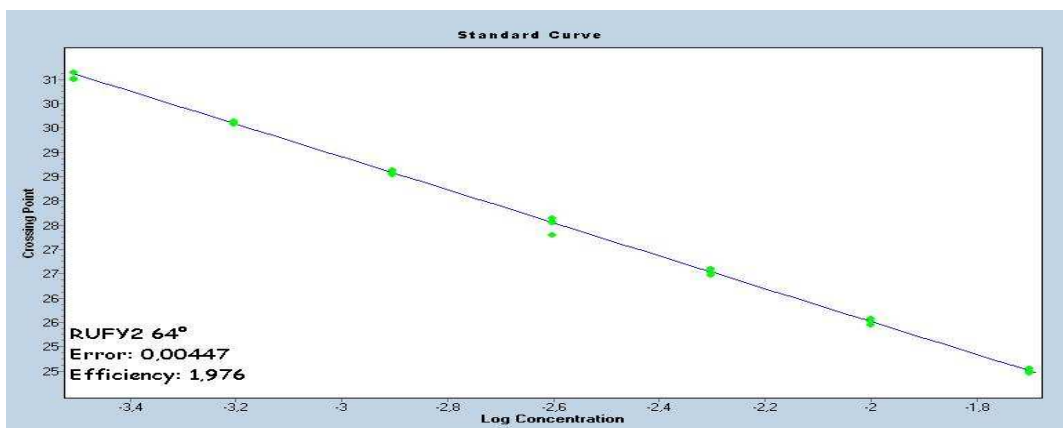
#### 4. Ergebnisse

**Tabelle 20: Übersicht der Referenzgene**

DTC (n=37)	Chromosomen Lokalisation	DTC-Proben mit	
		Amplifikation (%)	Deletionen (%)
AGTR1	3q24	27,0	0,0
Blue Cone P	7q31.3-q32	18,9	5,4
CACNA1D	3p14.3	2,7	0,0
GZMB	14q11.2	0,0	0,0
RUFY2	10q22.2	13,5	0,0
SMYD1	2p11.1	5,4	2,7

#### 4.4.2 Cyclin D1 Amplifikation in disseminierten Tumor Einzelzellen

Mit jedem Primerpaar wurde mit verschiedenen Temperaturen die beste Effizienz bestimmt (Verdünnungsreihe in Triplikaten) und gespeichert. Daraus ergaben sich unterschiedliche Annealing-Temperaturen, da ein Primerpaar bei 55 °C bessere Werte zeigte, als bei 60 °C. Es wurde versucht bei der Effizienz so nahe wie möglich an 2,000 zu kommen, um den Fehler (<0,01) so gering wie möglich zu halten.



**Abbildung 34: Beispiel einer Standardkurve des Referenzgens RUFY2**

Von 101 der 123 DTC-Proben konnte mit der Cyclin D1 qPCR folgende Ergebnisse erzielt werden:

In 11 Proben konnte ein Schwellenwert von über 0,95 erreicht werden. Diese Proben haben somit eine deutlich höhere Kopienanzahl für Cyclin D1 als normal und wurden demnach als positiv gewertet und in **Tabelle 21** zusammengefasst (komplette Ergebnistabelle s. **Tabelle 42** im Anhang). Insgesamt haben 22,9 % der DTC-Patienten eine Amplifikation für das Cyclin

#### 4. Ergebnisse

D1. Die meisten Cyclin D1 positiven kamen bei der Gruppe der DTC aus dem pN0-Stadium vor mit 23,3 % und mit 20 % bei den pN1 Patienten. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen pN0 und pN1.

**Tabelle 21:** Ergebnisse der Cyclin D1 qPCR der DTC

A) Patient n=41	CCND1 pos	CCND1 neg	Gesamt	% positive	NA
DTC	8	27	35	22,9	6
DTC pN0	7	23	30	23,3	4
DTC pN1	1	4	5	20	2
p-Wert pN0 vs. pN1	p=1				

B) Proben n=123	CCND1 pos	CCND1 neg	Gesamt	% positive	NA
DTC	11	90	101	10,9	22
DTC pN0	10	80	90	11,11	14
DTC pN1	1	10	11	9,1	8
p-Wert pN0 vs. pN1	p=1				

Cyclin D1 qPCR Ergebnisse auf **A:** Patienten- und **B:** Probenebene. (p-Wert mittels Vierfeldertest; Fisher Exakt Test; p-Wert two-tailed).

Um zu klären, ob in den Cyclin D1 positiven Proben auch eine sichtbare Amplifikation in ihren CGH-Profilen besteht, wurde ein Abgleich zwischen den CGH Ergebnissen der Chromosomenregion 11q13 und der qPCR durchgeführt (**Tabelle 22**). In nur 8,5 % der DTC-Proben korrelierte eine Amplifikation in der Region von 11q13 in der CGH mit einem positiven Cyclin D1 Ergebnis.

**Tabelle 22:** Vergleich zwischen den Ergebnissen der CGH (11q13) und qPCR (Cyclin D1)

CGH 11q13	CCND1	Vorkommen in Proben	%
amp	pos	4	8,5
neg	pos	2	4,3
amp	neg	10	21,3
neg (+NP)	neg	23	48,9
NA	pos	5	10,6
amp	NA	3	6,4
Summe		47*	

amp=Amplifikation, neg=negative, pos=positive, NA=nicht durchführbar, NP=normal Profil, n=47 (\*76 Proben sind hier nicht vergleichbar aufgrund des fehlenden CGH-Profiles und/oder den qPCR Ausfällen).

### 4.4.3 Cyclin D1, B-RAF und N-RAS

Der Vergleich mit den Vorkommen der Onkogene B-RAF und N-RAS in den DTC-Proben ist in **Tabelle 23** zusammengefasst. Anhand dieser Auswertung gab es nur eine DTC-Probe in der eine B-RAF Mutation zusammen mit einer Cyclin D1 Amplifikation gemeinsam vorkam (1 %). In 76,8 % war weder eine Mutation in N-RAS oder B-RAF vorhanden noch dazu eine Cyclin D1 Amplifikation. Es gab keine Kombination von N-RAS Mutation und Cyclin D1 Amplifikation. 9,1 % der Cyclin D1 positiven Zellen kamen mit einem Wildtyp für B-RAF und N-RAS zusammen. Genau wie umgekehrt, die DTC, die eine Mutation in B-RAF und N-RAS Gen haben, zeigten in 3 % und 10 % der Proben ein negatives Ergebnis für Cyclin D1.

**Tabelle 23:** Vergleich zwischen B-RAF, N-RAS und CCND1 in den DTC Proben

Variante	B-RAF	N-RAS	CCND1	Vorkommen (%)
1	wt	wt	neg	76,8
2	wt	wt	pos	9,1
3	mt	wt	neg	3,0
4	mt	wt	pos	1,0
5	wt	mt	neg	10,1
Summe				n=99

*neg=negative, pos=positive, wt=wildtyp, mt=Mutation; n=99; 24 Proben sind nicht vergleichbar aufgrund der fehlender Ergebnissen.*

## 4.5 Klinische Parameter und molekulare Evolution beim Melanom

Anhand der verfügbaren klinischen Daten der Patienten wurde überprüft, ob sich charakteristische Unterschiede in der CGH und dem Mutationsvorkommen ergeben. Die Früherkennung des Melanoms spielt für die weitere Prognose eine wesentliche Rolle. Das Melanom eignet sich in besonderer Weise für die Früherkennung, da es sich in den meisten Fällen bereits klinisch eindeutig erkennen lässt. Eine zusätzliche Auswertung nach den Untergruppen des Probenkollektivs (**Tabelle 8**) war daher zusätzlich möglich. Betrachtet wurden Histologie-Subtypen, Geschlecht, Alter, Lokalisation, Breslow-Index, Lymphknoten-Status, Clark-Level, Ulzeration, Regression und Sonnen-Exposition.



### 4.5.1 Analysen zu den Histologie-Subtypen

#### 4.5.1.1 Chromosomale Veränderungen in den Histologie-Subtypen

Mit den vorhandenen CGH-Profilen wurden die chromosomalen Veränderungen betrachtet, die charakteristisch für den jeweiligen Histologie-Subtyp (SSM, NM und ALM) des malignen Melanoms sein könnten. In **Tabelle 24** ist die Anzahl der CGH-Profile aufgelistet. (Die Gruppe der Sonderformen wurde aufgrund der niedrigen Fallzahlen hier nicht weiter betrachtet.)

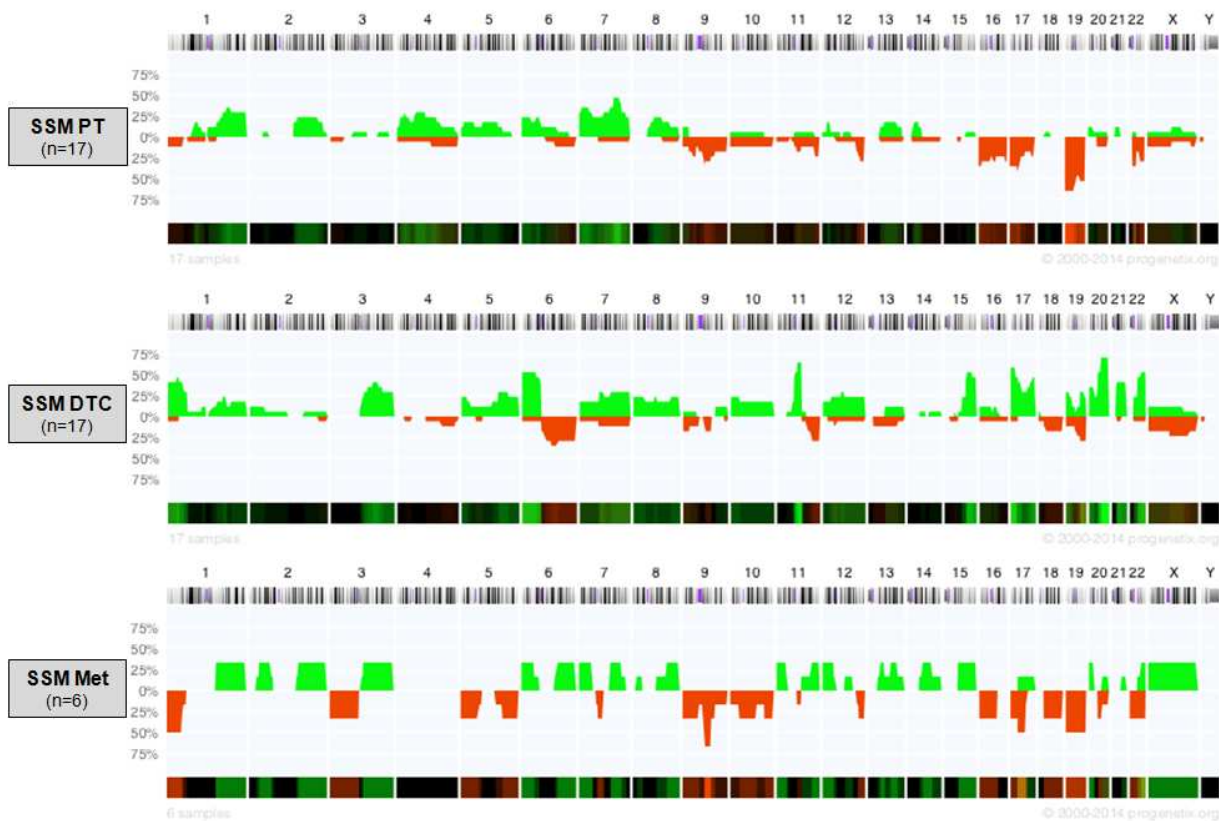
**Tabelle 24:** Anzahl der CGH-Profile in den Histologie-Subtypen

Histologie	Tumortyp	Anzahl der Profile	davon Normalprofile	aberrante Profile
SSM	PT	17	0	17
	DTC	21	4	17
	Met	6	0	6
	Summe	44	4	40
NM	PT	5	0	5
	DTC	13	1	12
	Met	2	0	2
	Summe	20	1	19
ALM	PT	3	0	3
	DTC	6	2	4
	Met	1	0	1
	Summe	10	2	8
Sonderformen	PT	3	0	3
	DTC	4	0	4
	Met	0	0	0
	Summe	7	0	7
Gesamt		81	7	74

#### Superfiziell spreitende Melanome

Die Gruppe der superfiziell spreitenden Melanome (SSM) ist in diesem Kollektiv am häufigsten verstreut. Für die CGH Auswertung der SSM stehen insgesamt 40 Profile zur Verfügung (ohne Normalprofile; 4x NP; **Abbildung 35**).

## 4. Ergebnisse



**Abbildung 35: Histoplot Bilder der superfiziell spreitenden Melanome**

Als grüne Balken sind die Amplifikationen und roten Balken die Deletionen dargestellt. Progenetix Version 2000-2014; M. Baudis; [www.progenetix.de](http://www.progenetix.de).

Die PT der SSM zeigen insgesamt mehr Deletionen als Amplifikationen. Die DTC dagegen zeigen deutlich mehr Amplifikationen. Hier gibt es viele amplifizierte Chromosomenregionen die bei über 25 % der Proben vorliegen. Die Chromosome 4 und 7 zeigen bei den Primärtumoren die häufigsten Zugewinne. Das Chromosom 19 ist bei über 50 % der PT-Proben deletiert. Die DTC zeigen ein gegengesetztes Histoplotbild als ihre PT. Hervorzuheben sind hier die Chromosomen 1p, 3q, 4, 6p, 11q, 15, 17 und 20.

Aufgrund der hohen Anzahl an Profilen der superfiziell spreitenden Melanome konnte hier der Median und der Mittelwert der Aberrationen in den einzelnen Tumortypen ermittelt werden (**Tabelle 25**). Die DTC und die Metastasen haben mit einer gesamt Aberrationenanzahl von 11,3 und 12,8 deutlich mehr als die PT mit 8,1. Hier zeigt sich in den Amplifikations-Mittelwerten zwischen PT und DTC ein statistischer Unterschied von  $p=0.042$  und in den Deletionen ein Unterschied von  $p=0.57$  (Mann-Whitney-U-Test; p-Wert two-tailed). Ein Unterschied zu den Metastasen ist hier nicht vorhanden (Probenanzahl zu gering).

**Tabelle 25: Zusammenfassung der Aberrationen-Anzahl des SSM-Probenkollektivs**

Tumortyp		Deletionen	Amplifikationen	Total	Profile
PT	min	0	0	1	n=17
	Median	2	3	5	
	Mittelwert	3,9	4,2	8,1	
	max	12	17	26	
DTC	min	0	0	4	n=17
	Median	2	8	10	
	Mittelwert	2,5	8,8	11,3	
	max	7	20	20	
p-Wert	DTC vs PT*	0.57	0.04	0.05	
Met	min	0	0	1	n=6
	Median	8	1,5	10	
	Mittelwert	5,8	7	12,8	
	max	10	19	28	
p-Wert	PT/DTC/Met**	0.46	0.03	0.20	
	PT vs Met*	0.58	0.78	0.60	
	DTC vs Met*	0.18	0.36	1	

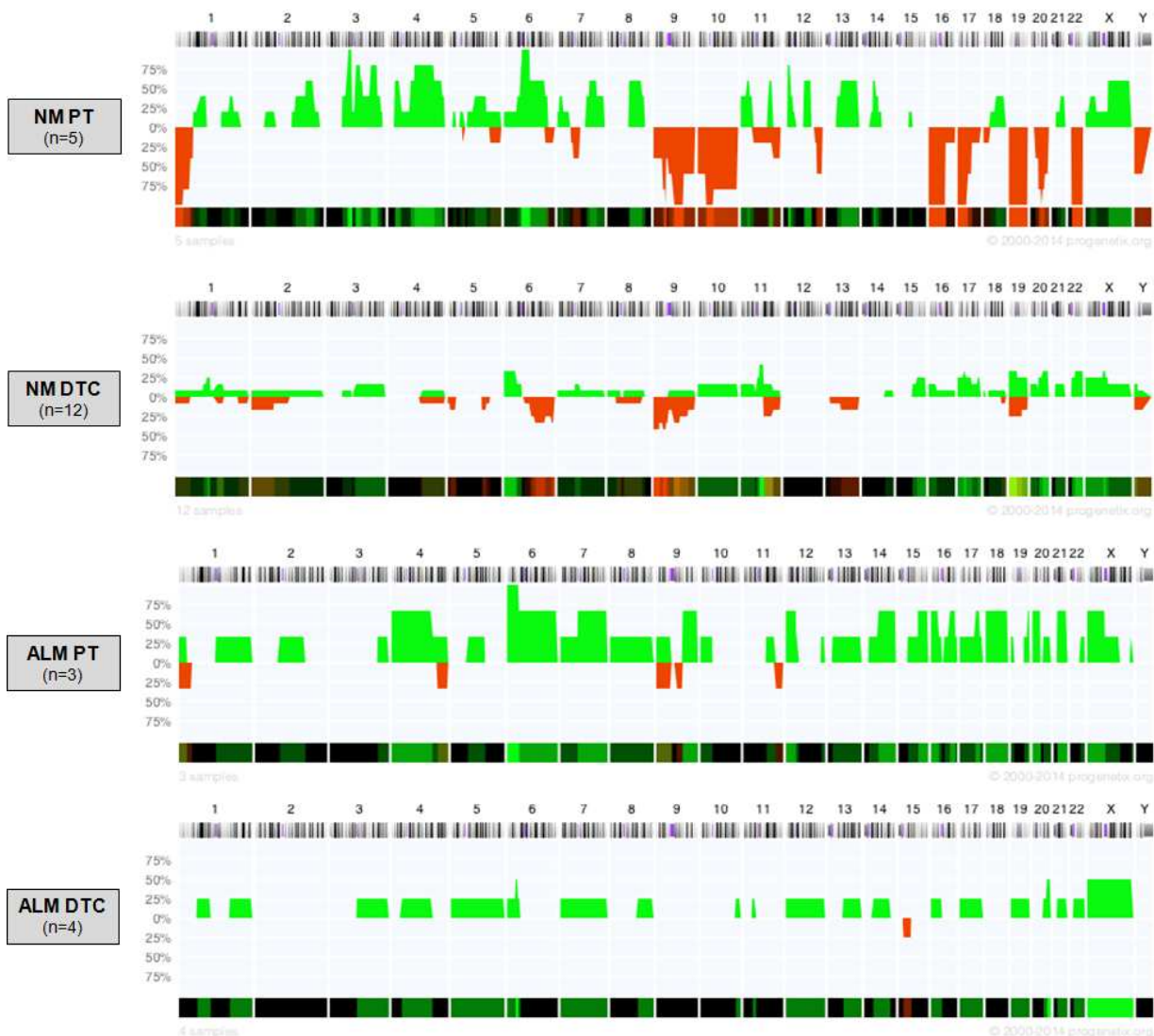
Hier wurden jeweils der Median und der Mittelwert berechnet; Angabe von Minimum (min) und Maximum (max); für die p-Wert Berechnung zwischen zwei Tumortypen wurde der \*Mann-Whitney-U-Test und zwischen allen drei Tumortypen (PT, DTC und Met) der \*\*Kruskal-Wallis Test ( $k=3$ ) verwendet; p-Wert two-tailed.

### Noduläre Melanome und akrolentiginöse Melanome

Die Gruppe der nodulären Melanome (NM) ist mit insgesamt 17 aberranten Profilen vertreten (ohne Normalprofile; **Abbildung 36**). Aufgrund der geringen Fallzahlen von PT der NM (5 Profile) sind hier die statistischen Aussagen mit Vorsicht zu interpretieren. Es zeigte sich dennoch, dass hier generell mehr Zugewinne vorhanden sind, als Verluste. Die DTC der NM zeigen mehr Amplifikationen als Deletionen. Diese sind über das gesamte Genom verteilt. Nur in wenigen Regionen kommt es zu einem Vorkommen von über 25 %, wie z.B. bei Chromosom 6p, 11q, 17p, 19, 20q und 21q.

Die akrolentiginösen Melanome (ALM) sind mit insgesamt nur 7 aberranten Profilen vertreten. Anhand der Histoplot Auswertung in **Abbildung 36** erkennt man sehr deutlich, dass die Gruppe der ALM für eine aussagekräftige Beurteilung nicht in Frage kommt. Hier lassen sich nur eventuelle Tendenzen bestimmen. Die Proben zeigen meist nur Zugewinne, vor allem bei den Primärtumoren, als Verluste.

## 4. Ergebnisse



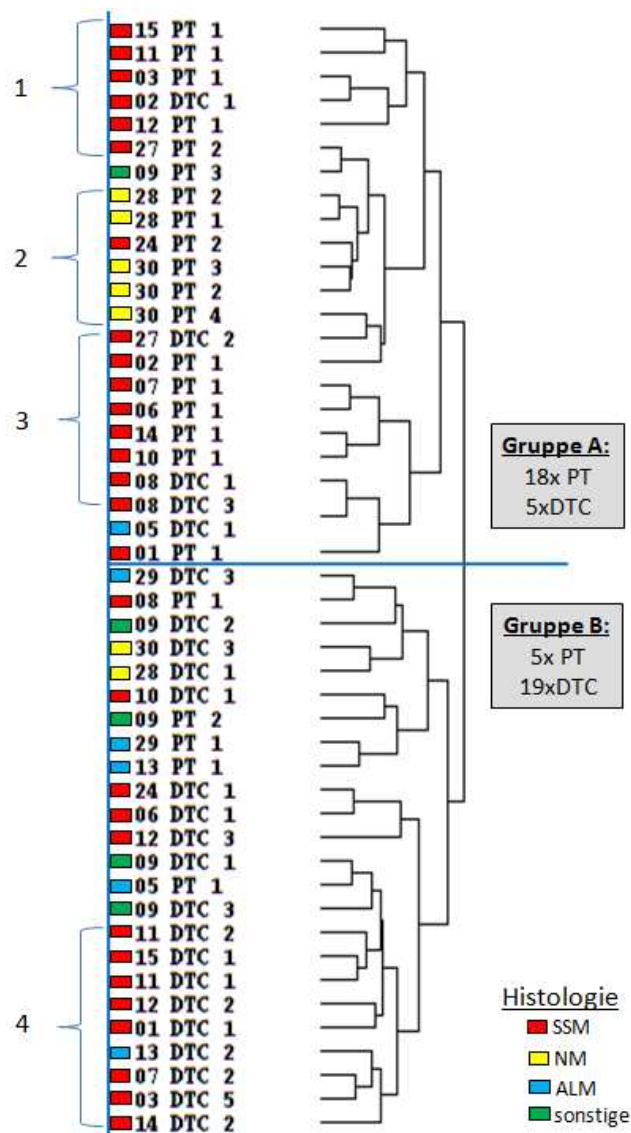
**Abbildung 36: Histoplot-Bilder der nodulären Melanome und der akrolentiginösen Melanome**  
Als grüne Balken sind die Amplifikationen und roten Balken die Deletionen dargestellt. Progenetix Version 2000-2014; M. Baudis; [www.progenetix.de](http://www.progenetix.de).

### Ähnlichkeitsanalyse der PT/DTC-Paare in den Histologie-Subtypen

Bei der Ähnlichkeitsanalyse der PT/DTC-Paare in den Histologie Subtypen (**Abbildung 37**) zeigt sich, dass auch hier eine Gruppierung der Proben vorhanden ist. In Gruppe A sind die SSM (rot Kästchen) mit insgesamt 16 Proben (**Tabelle 26**) stark vertreten, danach folgen die NM. Vor allem sind hier die PT der SSM und der NM vorhanden. Die DTC dazu liegen in Gruppe B. Auch in der Ähnlichkeit (Lage zu einander) liegen die SSM in kleineren Grüppchen (1, 3 und 4) zusammen. In Gruppe 1 sind sich 6 Proben und in Gruppe 3 sogar 8 Proben der SSM genomisch sehr ähnlich. In Gruppe 2 sind hauptsächlich die NM (gelbe Kästchen) mit 5 Proben zusammen gruppiert. Hier handelt es sich nur um die PT-Proben. Die dazugehörigen DTC (Pat

#### 4. Ergebnisse

28 und 30) liegen in Gruppe B beieinander. Und in Gruppe 4 sind 8 SSM Proben (vorwiegend DTC) sich genomisch ähnlich. In Gruppe B dagegen kommen fast alle ALM (blaue Kästchen) und die sonstigen Melanome (grüne Kästchen) vor. Die Primärtumore und die DTC der ALM sind sich demnach ähnlicher, als die PT und DTC bei den SSM und NM.



**Abbildung 37: Dendrogramm der PT/DTC-Paare und deren Histologie**

Links am Bildrand sind die einzelnen Proben der Patienten der PT/DTC-Paare (n=19; mit 47 Proben) aufgelistet. Die Histologie der Proben ist farblich dargestellt. Danach folgt das dazugehörige Dendrogramm (complete linkage Methode). Dieses kann in zwei große Äste (Gruppe A und B) eingeteilt werden. Nummer 1-4 stellen kleinere Grüppchen dar.

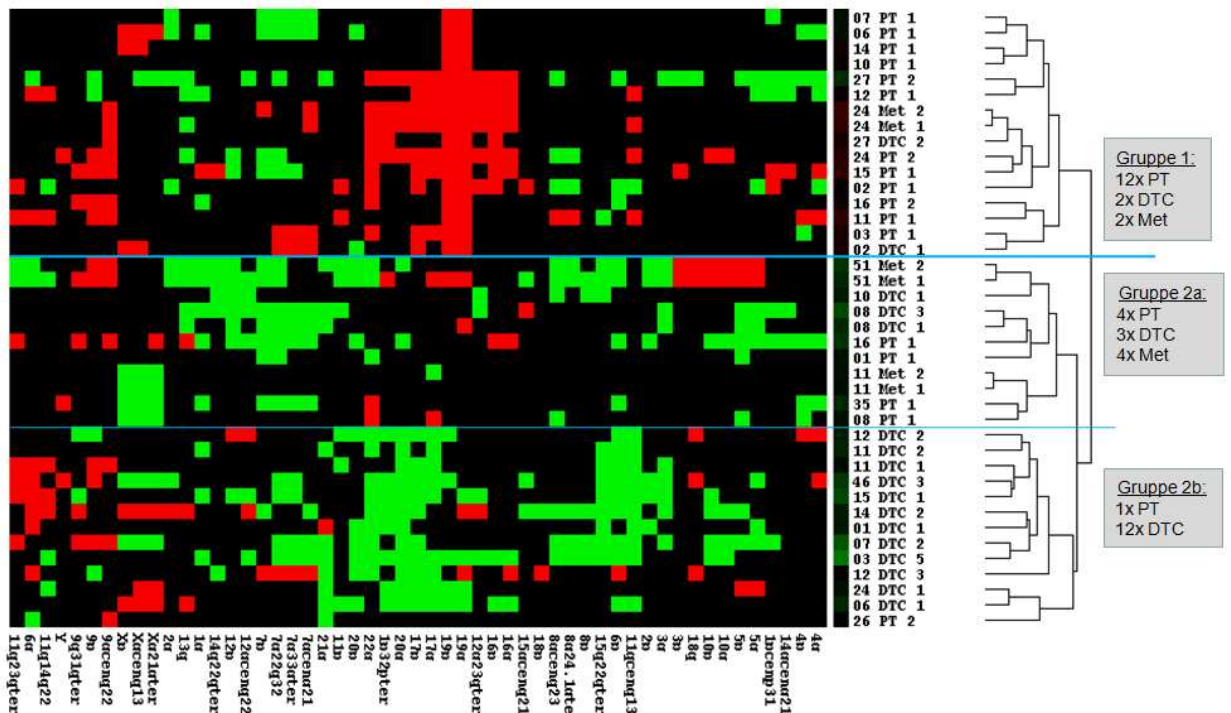
**Tabelle 26:** Probenanzahl in den Histologie-Subtypen der PT/DTC-Paare

Histologie Subtyp	Gruppe A		Gruppe B	
	PT	DTC	PT	DTC
SSM	12	4	1	12
NM	5	0	0	2
ALM	0	1	3	2
sonstige	1	0	1	3

Aufgrund der hohen Anzahl an SSM Profilen ist hier eine Clusteranalyse möglich (40 SSM Proben; **Abbildung 38**). Dadurch erhält man wieder 2 große Äste bzw. Gruppen. In der Gruppe 1 sind 16 SSM Proben und in der Gruppe 2 24 Proben. Die Gruppe 1 besteht mehr aus PT-Proben (12), als aus DTC- oder Met-Proben (mit jeweils nur 2-mal vertreten). Die Gruppe 2 lässt sich nochmal in zwei weitere Gruppen aufteilen. Die Gruppe 2a ist sehr homogen mit 4 PT-, 3 DTC- und 4 Met-Proben. Die Gruppe 2b dagegen besteht bis auf eine PT-Probe komplett aus DTC-Proben (12 Proben). Wie schon zuvor bei der allgemeinen Auswertung (**Abbildung 24**), sind sich die DTC-Proben der SSM Patienten ähnlicher, als zu ihren eigenen PT- oder Met-Proben. Auch hier liegt der Hauptunterschied in den Chromosomenregionen vom 1p, 12q, 16, 17, 19 und 20. In der Gruppe 1 haben diese Chromosomenregionen Deletionen und die Gruppe 2b dagegen Amplifikationen. Die Gruppe 2a zeigt in diesen Regionen keine Veränderungen. Dafür aber häufiger Amplifikationen in den Chromosomenregionen von 7 und 12p.

Zusammengefasst zeigen die PT-Proben auf genomischer Ebene keine Gemeinsamkeiten mit ihren DTC.





**Abbildung 38: Hierarchische Cluster-Analyse der gesamten SSM Proben**

Cluster der gesamten 40 SSM Proben (complete linkage Methode). Unten die Chromosomenregionen (54-Banden-Einteilung); rechts Proben mit den Verwandtschaftsverhältnisse als Dendrogramm; 3 Gruppierungen 1; 2a und 2b; grüne Kästchen = Amplifikationen; rote Kästchen = Deletionen.

#### 4.5.1.2 B-RAF, N-RAS und Cyclin D1 in den Histologie-Subtypen

Um festzustellen, wie ähnlich sich die PT und ihre DTC in den einzelnen Histologie Subtypen beim Mutationsvorkommen sehen, wurde in **Tabelle 27** die Ergebnisse der Onkogene B-RAF und N-RAS nach den Histologie-Subtypen sortiert. Die komplette Aufstellung des Mutationsvorkommen auf Probenebene der SSM, NM und ALM inklusiv aller p-Werte sind im Anhang aufgeführt (**Tabelle 44 - Tabelle 46**).

Bei den PT der SSM kommt in 26,3 % der Patienten eine B-RAF Mutation vor und in 22,2 % eine N-RAS Mutation. Bei den DTC sind nur 5% der Patienten B-RAF mutiert, aber 21,1 % der Patienten haben eine N-RAS Mutation. Zwischen PT- und DTC-Proben kommt es daher zu einem statistischen Unterschied von  $p=0.001$  für das Onkogen B-RAF (bei Patienten  $p=0.09$ ; **Tabelle 28**; Fisher Exakt Test;  $p=\text{two-tailed}$ ). Alle SSM Patienten mit Metastasen haben eine B-RAF Mutation und keine N-RAS Mutation.

Bei den Patienten mit einem NM kommt eine B-RAF Mutation in allen drei Tumortypen vor. Bei den PT sind 60 % der Patienten positiv. Die N-RAS Mutation kommt dagegen nur in den DTC vor (27,3 %). Beim Onkogen B-RAF kommt es zwischen PT- und DTC-Proben der NM zu

#### 4. Ergebnisse

einem statistischen Unterschied von  $p=0.02$  (bei Patienten  $p=0.3$ ; **Tabelle 28**; Fisher Exakt Test;  $p=two\text{-}tailed$ ). Auch die Patienten mit ALM haben öfters das B-RAF Gen mutiert, als das N-RAS Gen.

Somit kommt die B-RAF Mutation in allen drei histologischen Subtypen vor (s. **Tabelle 43** im Anhang).

**Tabelle 27:** *Mutationsvorkommen von B-RAF und N-RAS in den Histologie Subtypen*

A) B-RAF	PT (n=35)		DTC (n=41)		Met (n=7)	
	PT mt	%	DTC mt	%	Met mt	%
SSM	5 / 19	26,3	1 / 20	5	3 / 3	100
NM	3 / 5	60	3 / 11	27,3	1 / 2	50
ALM	2 / 6	33,3	0 / 6	0	1 / 2	50
sonstige	3 / 5	60	0 / 4	0	-	-
<b>Total</b>	13 / 35	37,1	4 / 41	9,8	5 / 7	71,4

B) N-RAS	PT (n=30)		DTC (n=40)		Met (n=7)	
	PT mt	%	DTC mt	%	Met mt	%
SSM	4 / 18	22,2	4 / 19	21,1	0 / 3	0
NM	0 / 3	0	3 / 11	27,3	0 / 2	0
ALM	0 / 5	0	1 / 6	16,7	0 / 2	0
sonstige	0 / 4	0	1 / 4	25	-	-
<b>Total</b>	4 / 30	13,3	9 / 40	22,5	0 / 7	0

Mutationsvorkommen von **A: B-RAF** und **B: N-RAS** bei den Patienten in den einzelnen Histologie Subtypen des malignen Melanoms.

**Tabelle 28:** *Übersicht der p-Werte in den Histologie-Subtypen*

B-RAF	p-Wert	SSM	NM	ALM
Proben	PT vs. DTC	$p=0.001$	$p=0.02$	$p=0.06$
Patienten	PT vs. DTC	$p=0.09$	$p=0.3$	$p=0.45$

N-RAS	p-Wert	SSM	NM	ALM
Proben	PT vs. DTC	$p=1$	$p=0.58$	$p=0.49$
Patienten	PT vs. DTC	$p=1$	$p=0.55$	$p=1$

$p$ -Wert mittels Vierfeldertest; Fishers Exact Test;  $p$ -Wert two-tailed.

In Betrachtung der Histologie-Subtypen der DTC mit Cyclin D1 haben die ALM Proben mit 13,3 % und die SSM Proben mit 11,5 % eine erhöhte Kopienanzahl für das Cyclin D1. In den DTC der nodulären Melanome ist das Cyclin D1 mit 3,4 % am niedrigsten vorhanden (**Tabelle 29**).

Insgesamt zeigen die superfiziell spreitenden Melanome mehr Mutationen in dem Protagonisten des MAPK-Signalweges, als die anderen Histologie-Subtypen des Melanoms.



**Tabelle 29: Cyclin D1 Amplifikation in den DTC der Histologie-Subtypen**

Histologie-Subtyp	CCND1	Total	%
<b>SSM</b> n=61	pos	7	11,5
	neg	44	72,1
		NA=10	
<b>ALM</b> n=15	pos	2	13,3
	neg	9	60
		NA=4	
<b>NM</b> n=29	pos	1	3,4
	neg	22	75,9
		NA=6	
<b>Sonstige</b> n=18	pos	1	5,6
	neg	15	83,3
		NA=2	
Summe		101	
nicht vergleichbar (NA)		22	

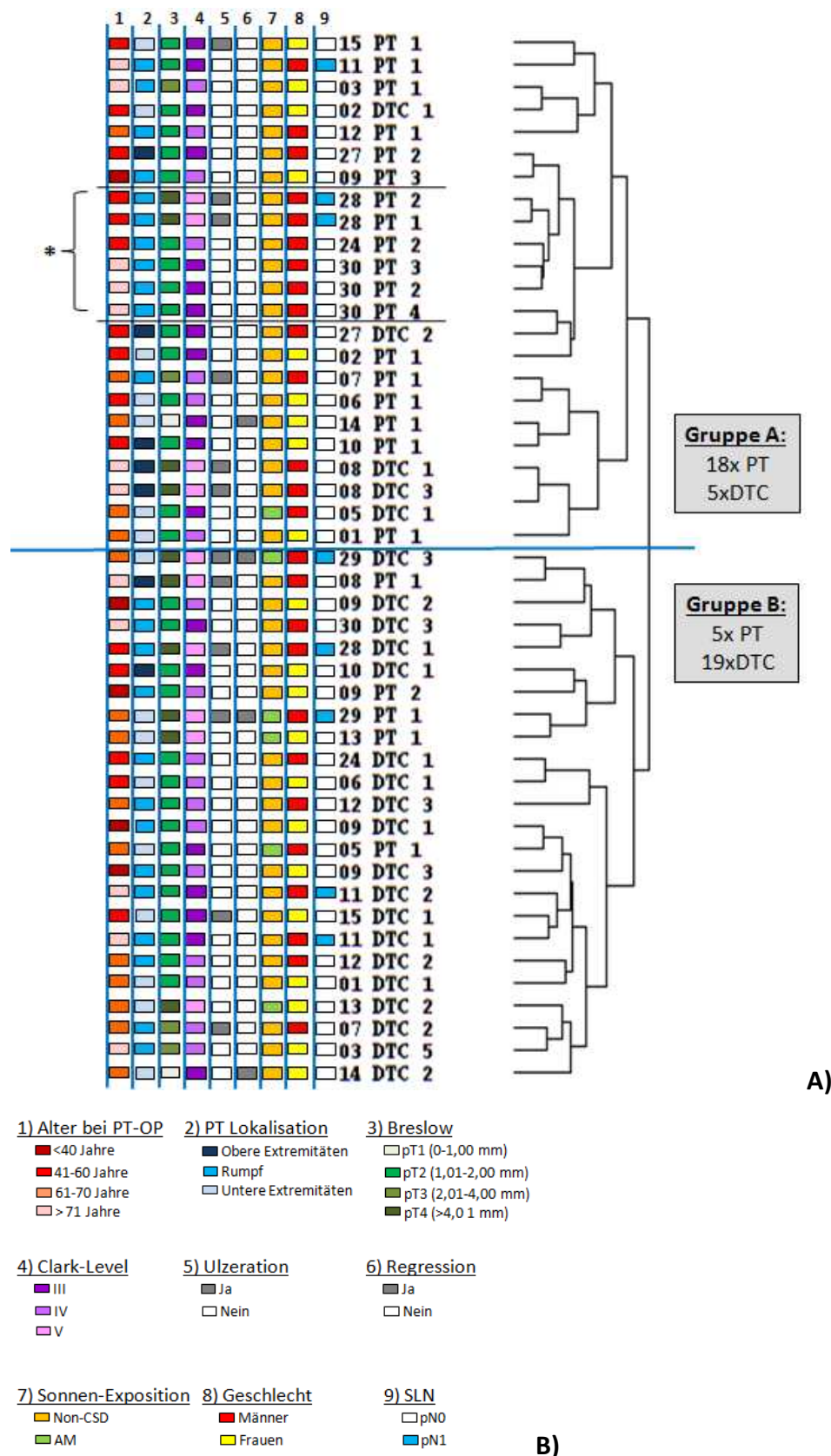
#### 4.5.2 Analysen zu den klinischen Parametern der Patienten

In diesem Teil der Auswertung liegt ein Augenmerk auf die Korrelation der Ergebnisse mit den aus **Tabelle 8** aufgeführten klinischen Parametern des Patientenkollektivs. Betrachtet wurden Geschlecht, Alter, Lokalisation, Breslow-Index, Lymphknoten-Status, Clark-Level, Ulzeration, Regression und Sonnen-Exposition.

##### 4.5.2.1 Korrelation zwischen klinischen Parametern und genomischen Veränderungen

In **Abbildung 39** wurden die Proben des Dendrogramm der PT/DTC-Paare (aus **Abbildung 24**) mit den klinischen Parametern verglichen. Anhand dieser Darstellung kann man eine kleine Gruppierung (siehe \*) erkennen. In dieser Gruppierung liegen 3 Männer mit dem PT am Rumpf (was auch in der Literatur beschrieben wurde), Non-CSD und keiner Regression der Zellen, nah beieinander. Diese 3 Patienten teilen sich vor allem die Deletionen der Chromosomenregionen 1p32pter, 9p, 9qcenq22, 10, 16, 17, 19, 20q und 22q (**Abbildung 40**). Patient 28 und 30 haben ein noduläres Melanom und Patient 24 ein superfiziell spreitendes Melanom. Ansonsten sind keine Gruppierungen nach den klinischen Parametern erkennbar.

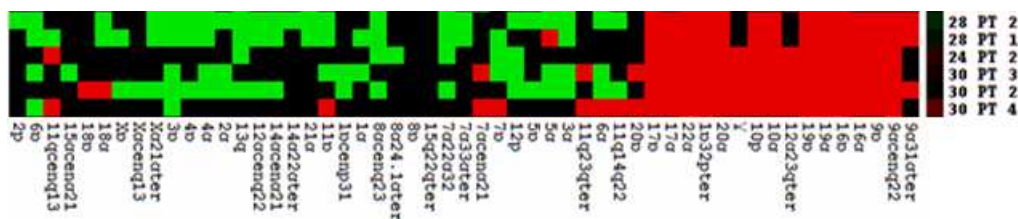
## 4. Ergebnisse



**Abbildung 39: Ähnlichkeitsanalyse der PT/DTC-Paare nach klinischen Parametern**

**A:** Dendrogramm mit den PT/DTC-Paare (n=19; mit 47 Proben, complete linkage Methode). Links am Bildrand die einzelnen Proben der Patienten, Rechts die Kästchen mit den klinischen Parametern. **B:** Farbcode der klinischen Parameter. \* kleine Gruppierung von Proben.

#### 4. Ergebnisse



**Abbildung 40: Cluster Ausschnitt der Gruppierung aus Abbildung 39.**

3 Männer mit dem PT am Rumpf, Non-CSD und keine Regression der Zellen. Rechts die Proben ID; Unten die Chromosomenregionen (54-Banden-Einteilung); Grüne Kästchen = Amplifikationen; rote Kästchen = Deletionen (complete linkage Methode).

#### 4.5.2.2 Korrelation zwischen klinischen Parametern und Onkogenen

Aufgrund der geringen Fallzahlen in einigen Parametern sind hier nur die Parameter aufgeführt, wo eine statistische Aussage möglich war. Die kompletten Auswertungen sind im Anhang (**Tabelle 48 - Tabelle 50**) aufgeführt.

#### Klinische Parameter und B-RAF Mutation

Hervorzuheben ist hier vor allem der statistische Unterschied beim Vorkommen einer Ulzeration der Zellen (**Tabelle 30**) mit einer B-RAF Mutation. Zwischen den Primärtumoren mit einer Ulzeration und keiner Ulzeration der Zellen kommt es zu einem signifikanten Unterschied von  $p=0.02$ . Bei den DTC kommt es zu einem  $p$ -Wert von  $p=0.07$  (Fisher Exakt Test,  $p$ -Wert two tailed). Zwischen Geschlecht, Lymphknoten-Status, Regression und Sonnen-Exposition wurden keine statistischen Unterschiede festgestellt (**Tabelle 48** im Anhang).

**Tabelle 30: Korrelation von Ulzeration mit der B-RAF Mutation**

B-RAF	PT				DTC				Met			
	n	mt	%	p=	n	mt	%	p=	n	mt	%	p=
<b>Gesamt</b>	35	13	37,1		41	4	9,8		7	5	71,4	
<b>Ulzeration</b>	35			<b>0.02*</b>	41			<b>0.07*</b>	7			0.43*
ja	10	7	70		12	3	25		3	3	100	
nein	25	6	24		29	1	3,4		4	2	50	

Auszug von **Tabelle 48**; n=Anzahl der Patienten. p-Werte mittels Fisher Exakt Test \*2x2 p-Wert two-tailed

Im Allgemeinen tritt die B-RAF Mutation in den PT bei allen klinischen Parametern auf. Beim Parameter Alter kommen keine B-RAF Mutationen in den DTC-Proben unter 40 Jahren vor. Bei den DTC-Proben kommt die B-RAF Mutation nur bei den SSM und NM vor. In allen drei Tumortypen wurde die B-RAF Mutation am meisten am Rumpf detektiert. Bei der Tumordicke

#### 4. Ergebnisse

(Breslow) kommen die detektierten B-RAF Mutationen nur im pT3- und pT4-Stadium vor, bei den Metastasen gleichmäßig von pT2 bis pT4. Beim Clark-Level ist die B-RAF Mutation in den Stadien III-V in allen drei Tumortypen vorhanden.

#### Klinische Faktoren und N-RAS Mutation

Aufgrund der geringen Anzahl der N-RAS Mutationen im Kollektiv konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden (**Tabelle 49** im Anhang). Jedoch ist hier erwähnenswert, dass alle N-RAS Mutationen bei den Primärtumoren vorkommen, die keine Ulzeration und keine Regression haben. Und auch die DTC zeigen hier mehr N-RAS Mutationen. Es kommt aber nicht zu einem signifikanten Unterschied. Bei den Metastasen konnte keine N-RAS Mutation detektiert werden.

Wenn man jedoch das Alter bei der PT-OP in nur zwei Gruppen aufteilt (Grenze 60 Jahre) dann wird eine Tendenz erkennbar, dass in den Patienten, die älter als 61 Jahre sind, mehr N-RAS Mutationen in den DTC aufweisen ( $p=0.03$ ; Fisher Exakt Test,  $p$ -Wert two tailed; **Tabelle 31**). Das gleiche ist beim Breslow-Index (Tumordicke) möglich. Hier haben die größeren Tumore ( $>2,01$  mm; pT3/pT4) bei den DTC mehr N-RAS Mutationen als die unter 2 mm ( $p=0.06$ ; Fisher Exakt Test,  $p$ -Wert two tailed).

**Tabelle 31:** Korrelation von Alter und Tumordicke mit der N-RAS Mutation

N-RAS	PT				DTC			
	n	mt	%	p=	n	mt	%	p=
<b>Gesamt</b>	30	4	13,3		40	9	22,5	
<b>Alter bei PT-OP</b>	30			0.63*	40			0.03*
<60 Jahre	12	1	8,3		18	1	5,5	
>61 Jahre	18	3	16,6		22	8	36,4	
<b>Breslow</b>	29			0.61*	39			0.06*
pT1/pT2 (<2,00 mm)	16	3	18,8		20	2	10	
pT3/pT4 (>2,01 mm)	13	1	7,7		19	7	36,8	

Auszug von Tabelle 49; n=Anzahl der Patienten.  $p$ -Werte mittels Fisher Exakt Test \*2x2  $p$ -Wert two-tailed

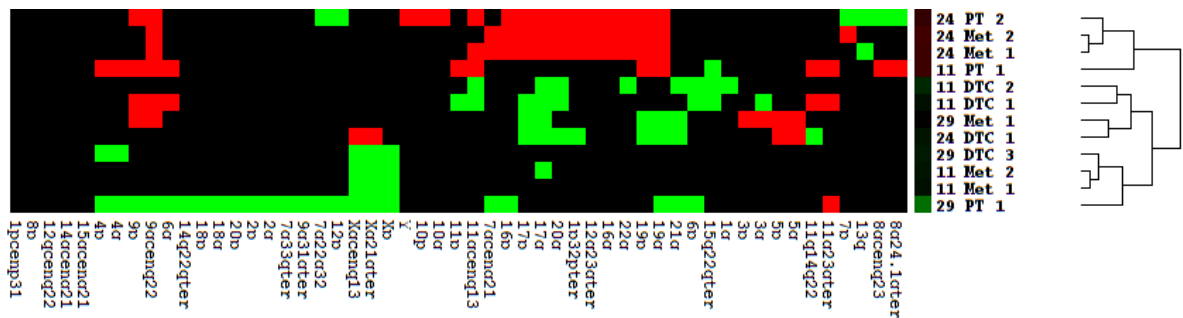
#### Klinische Parameter und Cyclin D1

Eine Cyclin D1 Amplifikation wurde generell in allen klinischen Parametern der DTC-Proben gefunden. Aufgrund der geringen Fallzahlen von Cyclin D1 Amplifikationen konnte hier keine Anhäufung der Amplifikation in einem Parameter gefunden werden und somit ergab sich kein nennenswerter statistischer Unterschied (**Tabelle 50** im Anhang).

#### 4.6 PT→DTC→Met: die Progression eines Patienten

Für die Darstellung eines möglichen Progressionsmodells stehen leider nur wenige Patienten mit allen drei Tumortypen (Triplet-Gruppe) zur Verfügung:

Für die hierarchische Cluster-Analyse stehen 3 Patienten mit einer Triplet-Gruppe zur Verfügung (**Abbildung 41**). Der Verwandtschaftsgrad der Proben von Patient 11 (SSM) liegt weit auseinander, da hier mehrere Aufzweigungen vorhanden sind. Der PT liegt in der oberen Gruppierung, die DTC liegen in der Mitte und die Metastasen liegen zusammen im unteren Teil des Dendrogrammes. Auch bei Patient 29 (ALM) sind sich die Proben untereinander nicht ähnlich. Hier besteht eine Verwandtschaft eher zwischen dem PT und dem DTC, als zur Metastase. Die Primärtumor-Probe und die beiden Metastasen-Proben von Patient 24 (SSM) sind sich zueinander ähnlicher als zu ihrer DTC-Probe.



**Abbildung 41: Hierarchische Cluster-Analyse der Progression**

Cluster der PT-DTC-Met Triplets (average linkage Methode); n=12 Proben von 3 Patienten. Unten Chromosomenregionen (54-Banden-Einteilung); rechts die untersuchten Proben aufgetragen mit den Verwandtschaftsverhältnisse als Dendrogramm; grüne Kästchen = Amplifikationen; rote Kästchen = Deletionen.

Bei der Mutations-Analyse der Onkogene stehen 4 Patienten zur Verfügung (**Tabelle 47** im Anhang). Bei den PT-Proben erkennt man, dass die B-RAF Mutation mit 60 % häufiger vorkommt, als die N-RAS Mutationen mit nur 14 %. Auch in den DTC-Proben kommt die B-RAF Mutation vermehrt vor, als die N-RAS Mutationen. Bei den Metastasen wurde nur die B-RAF Mutation detektiert, alle 4 Patienten sind positiv für B-RAF (**Abbildung 42**). Bei den Primärtumoren sind es 75 %. Die N-RAS Mutation kommt nur bei den PT und DTC vor, jedoch nicht bei den Metastasen. Hier zeigt sich, dass in drei von vier Patienten, der Primärtumor dieselbe Mutation besitzt, wie die Metastase. Diese Gruppe ist jedoch in ihrer Probenanzahl viel zu klein um einen aussagekräftigen Unterschied zu erlangen. So erhält man einen p-Wert

#### 4. Ergebnisse

von  $p=0.095$  (6 Feldertest; Fisher Exakt Test; p-Wert two-tailed). Nur eine DTC-Probe (Patient 04) besitzt eine B-RAF Mutation und ist auch für Cyclin D1 positiv. Leider sind hier die meisten DTC-Proben in der qPCR für das Cyclin D1 nicht auswertbar gewesen. Somit konnte das Cyclin D1 hier nicht mit in die Auswertung mit einfließen.

Dieser Versuch ein eindeutiges Progressionsmodell zu erhalten ist aufgrund der geringen Patientenanzahl leider nicht möglich. Aber man kann die Ergebnisse zumindest als eventuelle Tendenz betrachten. Die DTC zeigen hier auf genomischer und molekularer Ebene keine Gemeinsamkeiten mit ihren PT oder mit den Metastasen.

Patienten-ID	B-RAF			N-RAS			Cyclin D1	n=4 Patienten
	PT	DTC	Met	PT	DTC	Met	DTC	
4	□□□	■□□□□	□■□□□□	□□□	□□□□□	□□□□□□	■□□□□	wt □ B-RAFmt ■ N-RASmt ■ Cyclin D1 amp ■ NA □
11	■	□□□	■□□□	■	□□□	□□□□	□□□	
24	■□□□	□□	□□■	□□□□	□□	□□□	□□	
29	■□	□□□	■□	□□	■□□	□□	□□□	

**Abbildung 42: Auswertung der Onkogene und des Cyclin D1 in der PT/DTC/Met-Triplet Gruppe**  
 Ein Kästchen entspricht einer Probe; wt=wildtyp; NA=nicht auswertbar.

## 5. Diskussion

Die Metastasierung des Melanoms in den ersten drainierenden Lymphknoten, den so genannten Wächterlymphknoten (SLN), beeinflusst das Überleben von Patienten mit klinisch lokalisierter Melanomerkrankung entscheidend (Balch *et al.*, 2001; Ulmer *et al.*, 2005 und 2014). Während zunehmend für das Melanom relevante Tumorgene beschrieben werden (MAPK1/2, ERBB4, GRIN2A, GRM3, RAC1 und PREX2; Kunz, 2014) ist der genaue molekulare Mechanismus noch umstritten, der zu den für die Melanomentstehung entscheidenden Mutationen und/oder chromosomalen Aberrationen führt.

Die vorliegende Arbeit basiert auf Studien der Arbeitsgruppen Klein und Ulmer (Kooperationspartner der Universität Tübingen) wichtige genomische Veränderungen zu identifizieren, die für die Entstehung und die systemische Progression des malignen Melanoms verantwortlich sein könnten. Ziel dieser Arbeit war es daher, das Auftreten wichtiger genomischer Veränderungen in einen zeitlichen Bezug zur Ausbreitung der systemischen Erkrankung zu setzen. Es wurde davon ausgegangen, dass Veränderungen, die nach Absiedelung der Zellen entstehen, zwischen Primärtumor (PT) und disseminierten Tumoreinzelzellen (DTC) aus SLN vom gleichen Patienten divergieren. Gemeinsame Veränderungen hingegen sollten vor der Absiedelung entstanden sein. Dafür konnten erfolgreich eine Gewebe- und DNA-Bank mit 48 Patienten und insgesamt 220 isolierten Tumortypen-Proben (PT, DTC und Met) angelegt und molekular untersucht werden.

### 5.1 Primärtumore und disseminierte Tumoreinzelzellen des malignen Melanoms divergieren auf chromosomaler Ebene

#### Chromosomale Divergenz in allen drei Tumortypen

Um die Identifizierung von genomischen Veränderungen in den drei Tumortypen der systemischen Melanomerkrankung (PT, DTC und Met) auf chromosomaler Ebene zu ermöglichen, wurde in dieser Arbeit die vergleichende Genomhybridisierung (CGH) verwendet. Durch diese Untersuchungsart konnten deutliche Unterschiede zwischen den drei Tumortypen des Melanoms festgestellt werden (**Abbildung 16**). So kam es bei der Berechnung der mittleren Anzahl an genetischen Veränderungen und dem Median zu einem signifikanten Unterschied zwischen den Deletionen der PT und der DTC ( $p=0.01$ ; Mann-Whitney-U-Test;  $p$ -Wert two-tailed, **Tabelle 11**). Auch bei den Deletionen zwischen PT, DTC

und Met liegt ein p-Wert von  $p=0.01$  vor (Kruskal-Wallis Test ( $k=3$ ); p-Wert two-tailed). Die mediane Anzahl chromosomaler Veränderungen in allen drei Tumortypen lag über den in der Literatur für die Primärtumore (6.3) und für die metastasierten Melanome beschriebenen Wert (7.8; Balázs *et al.*, 2001). Der höchste Wert (12) kam in den Primärtumoren vor (DTC: 9 und Met: 9; **Tabelle 11**).

In den Primärtumoren und den Metastasen konnten zudem auch schon bekannte häufig auftretende Veränderungen, wie der Verlust von Chromosom 9 und Zugewinne auf Chromosom 7, 8qcenq23 und 6p nachgewiesen werden, diese Regionen scheinen eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung zu spielen (**Tabelle 10**; Bastian *et al.*, 1998; Balázs *et al.*, 2001; Ulmer *et al.*, 2005). Über die DTC aus SLN wurde bislang wenig in der Literatur beschrieben. Chromosomale Veränderungen wurden erstmals von Ulmer *et al.* (2005) für 24 DTC aus SLN dargestellt. Viele der dort gefundenen Veränderungen kamen auch in den insgesamt 44 DTC-Proben dieser Arbeit vor, wie die Amplifikationen auf Chromosom 6p, 15q und 20q und die Deletionen auf Chromosom 6q und 9.

Chromosomale Verluste werden in der Literatur als ein frühes, und chromosomale Zugewinne als ein spätes Ereignis in der Melanomentwicklung beschrieben (Bastian *et al.*, 1998). Die Korrelationen zwischen den Regionen und der veränderten Kopienanzahl in dieser Arbeit könnten dazu beitragen, dass wie vermutet der Verlust von Chromosom 9 früh in der Melanom-Progression auftritt, wohingegen der Zugewinn von Chromosom 7 später auftritt (Bastian *et al.*, 1998; Balázs *et al.*, 2001).

### **Chromosomale Divergenz in den PT/DTC-Paaren eines Patienten**

Der Nachweis, ob eine Ähnlichkeit bzw. eine Verwandtschaft zwischen zwei Melanom Tumortypen eines Patienten besteht (PT und DTC), konnte mittels der hierarchischen Cluster-Analyse nachgegangen werden. Insgesamt konnten in dieser Arbeit 47 Proben von 19 Patienten zum direkten Vergleich der Aberrationsmuster herangezogen werden. Es zeigte sich, dass die Primärtumore und die DTC auch vom selben Patienten in ihren chromosomalen Veränderungen sich deutlich voneinander unterscheiden (**Abbildung 23** und **Abbildung 24**). Die Primärtumore verschiedener Patienten sind sich untereinander ähnlicher als zu ihren korrespondierenden DTC. Insgesamt kam diese Ähnlichkeit der Primärtumore dadurch zustande, dass sie sich alle mehrere gleiche Deletionen auf denselben Chromosomenregionen teilten (**Tabelle 12**), wohingegen diese Regionen bei den DTC einen Zugewinn aufwiesen. Im



## 5. Diskussion

Einzelnen sind dabei hervorzuheben, die Gewinne auf Chromosom 1p32pter, 11qcenq13, 16, 17, 19, 20q und 22q der DTC, sowie entgegengesetzt deren Verluste bei den PT. Andere Veränderungen wie die Amplifikationen auf Chromosom 15q22qter, die in vielen DTC zu finden waren, fehlten dagegen in den meisten PT. Dafür zeigten die PT gehäuft Amplifikationen von 4q (50 %).

In den letzten Jahren wurden bei der Analyse von genetischen Veränderungen im Melanom immer wiederkehrende Mutationen identifiziert, die zur Aktivierung von Signalwegen führen und so das Wachstum und das Überleben von Tumorzellen fördern (Daud u. Bastian, 2012; Kunz, 2014). Die bisher vorliegenden Forschungsergebnisse sprechen dafür, dass die MAPK- und AKT-Signaltransduktionswege vielversprechende Zielstrukturen für die wirksame Melanombehandlung bieten können. Viele dieser Gene liegen in den hier veränderten Chromosomenbereichen und sind in **Tabelle 32** aufgeführt.

**Tabelle 32: Kandidatengene mit einer möglichen Rolle beim malignem Melanom**

Chromosom	PT/DTC-Paare		Kandidatengene	Melanom Publikation
	PT (n=18)	DTC (n=19)		
<b>1p32pter</b>	44 % del	47 % amp	mTOR	Karbowniczek <i>et al.</i> , 2008
<b>4q</b>	50 % amp	---	c-KIT EGF FBXW7	Balázs <i>et al.</i> , 2001; Carvajal <i>et al.</i> , 2011 Daud u. Bastian, 2012 Mao <i>et al.</i> , 2008
<b>6p</b>	33 % amp	58 % amp	---	---
<b>7q22q32</b>	56 % amp	16 % amp	TRRAP GRM3	Kunz, 2014 Kunz, 2014
<b>11qcenq13</b>	22 % del	63 % amp	Cyclin D1	Curtin <i>et al.</i> , 2005; Sauter <i>et al.</i> , 2002
<b>15q22qter</b>	6 % amp	47 % amp	MEK1 (MAP2K1)	Nikolaev <i>et al.</i> , 2011
<b>16</b>	50-61 % del	16 % amp	ERK1 (MAPK3) GRIN2A	Daud und Bastian, 2012 Pollock <i>et al.</i> , 2003; Wei <i>et al.</i> , 2011; Stark <i>et al.</i> , 2011; Nikolaev <i>et al.</i> , 2011
<b>17</b>	56-67 % del	53-58 % amp	TP53	Houben <i>et al.</i> , 2011; Avery-Kiejda <i>et al.</i> , 2011
<b>19</b>	94 % del	21 % amp	MEK2 (MAP2K2) GNA11 AKT2	Nikolaev <i>et al.</i> , 2011 Van Raamsdonk <i>et al.</i> , 2010 Kunz, 2014
<b>20q</b>	44 % del	79 % amp	---	---
<b>22q</b>	61 % del	53 % amp	ERK2 (MAPK1)	Daud und Bastian, 2012

Tabelle erstellt nach Kunz (2014), Daud und Bastian (2012). del=Deletion; amp=Amplifikation

Auffallend waren die Chromosomenregionen 6p und 20q bei den DTC: 79 % der DTC-Proben zeigten bei den PT/DTC-Paaren eine Amplifikation auf 20q. Auch in den DTC von Ulmer *et al.* (2005) wurde diese Amplifikation gehäuft gefunden. Für diese Chromosomenregion ist bis jetzt kein Gen bekannt, das bei der Melanom Progression eine Rolle spielen könnte.

Die Chromosomenregion 6p zeigte in den PT (33 %) und in den DTC (58 %) eine erhöhte Amplifikation (**Tabelle 10**). Diese wurde auch schon in anderen Primärtumor Studien vom malignen Melanom beschrieben (Bastian *et al.*, 1998; Balázs *et al.*, 2001; Namiki *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2007). Aufgrund einer Fehlverteilung kommt es bei Chromosom 6 jedoch oft zu einer Isochromosom-Formation (6p Trisomie/Amplifikation und 6q Monosomie/Deletion; Balázs *et al.*, 2001; van Dijk *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2007). Die Kombination von 6p Gewinn und 6q Verlust findet man hier in 21 % der DTC-Proben (4/19) und in 5 % der PT-Proben (1/18) wieder. In den restlichen Proben liegt entweder nur ein 6p Gewinn oder ein 6q Verlust vor. Eine andere CGH Arbeit zeigte, dass Tumore mit einer 6p Amplifikation eine niedrige Überlebensrate hatten, als Tumore ohne diese Amplifikation (Namiki *et al.*, 2005). Eine Assoziation zwischen Aberrationen und Prognose wurde zudem in vielen anderen Tumoren gefunden (Pinkel u. Albertson, 2005; Santos *et al.*, 2007). Bei Namiki *et al.* (2005) wurde die 6p Amplifikation bei den dicksten Tumoren (pT4) vermehrt gefunden. Dies führte zu einem niedrigen medianen Gesamtüberleben (overall survival) und bedeutete für diese Patienten eine schlechtere Prognose. All das würde bedeuten, dass eine Amplifikation von 6p hier ein frühes Ereignis in der Melanom Progression darstellt. Das Vorkommen der 6p Amplifikation in den PT und in den DTC legt zudem nahe, dass sich hier ein oder mehrere Onkogene befinden müssten, die in der Melanom Progression eine Rolle spielen könnten. Weitergehende Studien müssen klären, ob Proto-Onkogene oder Tumorsuppressor Gene auf 6p und 20q existieren, die mit der Melanom Progression assoziiert sein könnten.

### 5.2 Akkumulation genomischer Veränderungen im Verlauf der Zeit

Beim malignen Melanom sind sowohl der RAS-RAF-MAPK- (über B-RAF und N-RAS) als auch der PI3K-AKT-Signaltransduktionsweg (über N-RAS) über mehrere Mechanismen konstitutiv aktiviert und haben daher Schlüsselfunktionen bei der Tumorentwicklung und -progression (Meier *et al.*, 2005; s. auch Einleitung Abschnitt 1.2.1). Aus diesem Grund, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob B-RAF und N-RAS klonal in allen disseminierten Tumoreinzellen gleichsinnig verändert waren, oder ob die Tumorzellen auch ohne B-RAF bzw. N-RAS Mutationen disseminieren konnten, obgleich im Primärtumor diese Mutationen vorlagen. Zur Bestimmung vom Mutationsstatus in den einzelnen Tumortypen konnte erfolgreich eine B-RAF- und eine N-RAS-spezifische SSCP-PCR etabliert werden (single strand conformation polymorphism, Orita *et al.*, 1989). Die in der Literatur beschriebenen häufigsten

Mutationstypen für B-RAF V600E und V600K, sowie für N-RAS Q61R und Q61K konnten im SSCP-Gel zu 100% identifiziert werden.

### **Unterschiedliches Mutationsvorkommen in den drei Tumortypen des Melanoms - Keine lineare Weitergabe der Onkogene B-RAF und N-RAS**

In der Literatur wurde beschrieben, dass eine Mutation entweder in N-RAS oder in B-RAF vorkommen kann, niemals zusammen in einem Tumor. Die beiden Mutationen schließen sich demnach gegenseitig aus (Curtin *et al.*, 2005; Gorden *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2003), was durch die hier gewonnenen Daten bekräftigt werden konnte (**Abbildung 32**). Darüberhinaus wurden die B-RAF Mutationen signifikant seltener in den DTC gefunden, als in den Primärtumoren ( $p \leq 0.001$ ; Fishers Exakt Test; p-Wert two-tailed; **Tabelle 16**). Offenkundig streuen die Melanomzellen häufig schon vor dem Eintreten einer B-RAF Mutation. Die N-RAS Mutationen kommen in diesem Kollektiv insgesamt seltener vor (7 %) als die B-RAF Mutation (14 %), jedoch häufiger in den DTC (**Tabelle 16**). In den Metastasen-Proben konnte nur die B-RAF Mutation (21 %) detektiert werden. Diese Daten zeigen auch in dem Mutationsstatus der beiden Onkogenen eine Trennung zwischen den Tumortypen des Melanoms. Gleichmaßen auch bei der Betrachtung der Histologie Subtypen SSM und NM. Hier kommt es beim Onkogen B-RAF zwischen den PT- und DTC-Proben zu einem statistischen Unterschied von  $p=0.001$  und  $p=0.02$  (**Tabelle 27, Tabelle 28**; Fisher Exakt Test; p-Wert two-tailed).

Noch deutlicher wurde der Unterschied anhand der Analyse der PT/DTC-Paare. Da hier nur in 7,1 % der Patienten sowohl im PT als auch in dessen DTC eine B-RAF Mutation ( $PT_{B\_mt1/mt2} - DTC_{B\_mt1}$ ) und in 3,6 % eine N-RAS Mutation ( $PT_{N\_mt1} - DTC_{N\_mt2}$ ) gefunden werden konnte (meist nicht vom selben Mutationstyp!). Bei den meisten Patienten lagen der PT und der dazugehörigen DTC in der Wildtyp-Form (wt) vor (43 %; **Abbildung 32**). Von den 16 mutierten Patienten haben in 18,8 % der Fälle beide Tumortypen eine Mutation in einem der besagten Onkogene. Daher kommt es zu einer Divergenz in den PT/DTC-Paaren von 81,2 % keine Punktmutationen in diesen Onkogenen zu teilen. Es kommt nicht zu einer eindeutigen linearen Weitergabe der beiden Onkogene von PT zu DTC. Die Melanomzellen benötigen zur Disseminierung in den Lymphknoten wohl keine B-RAF bzw. N-RAS Mutationen, jedoch scheint die B-RAF Mutation zum Auswachsen der Metastase in den anderen Organen eine Rolle zu spielen.

In anderen Studien wurden in 82 % der melanozytären Nävi (dysplastische und kongenitale Nävi), die als Vorstufe für Melanome diskutiert werden, B-RAF Mutationen nachgewiesen (Pollock *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2007). Dies legt nahe, dass die Mutation B-RAF ein frühes Ereignis in der neoplastischen Transformation von Melanozyten ist, jedoch nicht alleine ausreicht selbst für die Malignität verantwortlich zu sein. Weitere genetische Veränderungen müssen demnach von den B-RAF mutierten Melanozyten innerhalb der Nävi erworben werden, um ein Melanom bilden zu können. Auch die N-RAS Mutationen wurden bei gutartigen melanozytären Nävi gefunden, insbesondere bei großen kongenitalen Nävi (Bauer *et al.*, 2007), und scheinen demnach auch nicht ausreichend zu sein, um vollständig Melanozyten zu verändern. B-RAF würde man demnach primär eine Rolle in der Melanominisation zuschreiben, während für die Progression der Zellen weitere Faktoren notwendig wären (weitere kooperierende Onkogene und/oder Tumorsuppressorgene). Die Disseminierung der Melanomzellen erfolgt nach den hier erhaltenen Analysen in einem sehr frühen Stadium, da die PT und DTC sich kaum Mutationen teilen (parallele Progression). Dies bedeutet, dass einerseits mehrere Gene an der Pathogenese beteiligt sind, und andererseits die einzelnen Gendefekte nicht zwingend für die Tumorinitiation notwendig sind. Als alleiniger Verursacher des metastasierenden Melanoms konnte hier weder das B-RAF noch das N-RAS verantwortlich gemacht werden.

### **B-RAF Mutationen häufiger in DTC aus pN1 und bei Zellen mit vorhandener Ulzeration**

In den Studien von Viros (2008) und Broekaert (2010) wurde festgestellt, dass Melanome mit einer B-RAF Mutation vermehrt in die regionalen Lymphknoten metastasieren, als Melanome ohne diese Mutation. Bei der Betrachtung des Lymphknotenstatus pN0 und pN1 der DTC kamen die B-RAF Mutationen zwar häufiger in den pN1-DTC (15 %) als in den pN0-DTC (1 %) vor, mit einer Signifikanz von  $p < 0.001$ . Bei N-RAS wiesen die pN1-DTC im Vergleich zu den pN0-DTC nur selten eine N-RAS Mutation auf ( $p = 0.45$ ; **Tabelle 16**; Fisher Exakt Test; p-Wert two-tailed). Jedoch ist die Anzahl von DTC aus pN1 zu gering, um hier eine Aussage diesbezüglich treffen zu können.

Hervorzuheben ist hier noch die Anzahl der B-RAF Mutationen in den Primärtumoren mit vorhandener Ulzeration. Hier lag ein p-Wert von  $p < 0.05$  vor, im Vergleich zu den PT ohne Ulzeration (Fisher Exakt Test; p-Wert two-tailed, **Tabelle 30** und **Tabelle 48** Anhang). Ulmer und Kollegen (2014) konnten in 1027 Melanom Patienten feststellen, dass die Tumor

Ulzeration, der DCCD-Wert und die Tumordicke die wichtigsten prognostischen Faktoren waren. Metastasierende Melanome mit einer B-RAF Mutation führten zudem zu einer schlechteren Prognose (Houben et al., 2004; Long et al., 2011). Die Korrelation von vorhandener B-RAF Mutation und Ulzeration könnte als Zeichen einer größeren Fähigkeit zur Metastasierung angesehen werden und würde demnach die Überlebensrate von Patienten beeinflussen.

### **Kein erhöhtes Vorkommen von Cyclin D1 in den DTC - gegenseitiger Mutationsausschluss**

Im Vergleich der CGH Profile von DTC und PT war die Chromosomenregion 11qcenq13 mit 39 % der auffälligste Unterschied (**Abbildung 33, Tabelle 19**). Die 11q13 Region beinhaltet mehrere mögliche Kandidatengene, wie das Cyclin D1. Cyclin D1 steht als ein weiteres Onkogen für das Melanom in Diskussion (Curtin et al., 2005; Sauter et al., 2002). Eine Amplifikation von Cyclin D1 wurde vor allem in Melanomen gefunden, die keine Mutation in den vorgeschalteten Kinasen hatten, woraus man vermutete, dass das Cyclin D1 ein unabhängiges Onkogen fürs Melanom sei (Sauter et al., 2002). Die Untersuchungsergebnisse der DTC zeigen hierzu erstmals, dass 23 % der DTC-Patienten eine Amplifikation für das Cyclin D1 haben (**Tabelle 21**). Die DTC aus pN0 sind zu 23 % und die aus pN1, trotz geringer Fallzahl, zu 20 % positiv. Bekannt ist, dass ein Amplikon auf Chromosom 11q13 gehäuft bei akrolentigonösen Melanomen an den stark sonnenexponierten Körperstellen auftritt (Balázs et al., 2001; Curtin et al., 2005). Auch bei den DTC vom ALM Subtyp in diesem Kollektiv kam das Cyclin D1 häufig vor (13 %; **Tabelle 48**). Jedoch scheint das Cyclin D1 nicht, wie vermutet eines der „Haupt-Onkogene“ in den DTC zu sein. Weil jedoch die 11qcenq13 Region hier durch eine hohe Amplifikation in den DTC betroffen ist, bis zu 41 % bei den DTC aus pN0 (bei PT 14 % und bei Met 11 % deletiert), lässt vermuten, dass dieser Bereich unter einem starken selektiven Druck während der Tumorprogression steht (**Tabelle 10**). Die Region von 11q13 umspannt allein fast 14 Mb und enthält mehr als 200 Gene, hier könnten folglich auch andere dort liegende Gene eine Rolle spielen. In Betracht würde zum Beispiel die Fibroblast Growth Faktoren 3 und 4 kommen, welche bereits 1988 von Adelaide und Kollegen im Melanom vermehrt amplifiziert gefunden worden sind.

In 76,8 % der DTC Proben war weder eine Mutation in N-RAS oder B-RAF vorhanden, noch eine Cyclin D1 Amplifikation. Es gab nur eine Zelle, die B-RAF mutiert war und zugleich eine erhöhte Amplifikation für das Cyclin D1 aufwies. Eine Kombination von N-RAS Mutation und

Cyclin D1 Amplifikation gab es in den DTC nicht (**Tabelle 23**). Dieses hier erhaltene Ergebnis bekräftigt die erweiterte These, dass sich Mutationen in dem RAS-RAF-MAPK-Signaltransduktionsweg gegenseitig aus schließen (Gorden *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2003; Curtin *et al.*, 2005). Vízkeleti *et al.*, (2012) fanden in Melanomen mit B-RAF (V600) oder N-RAS (Q61) Mutationen niedrigere Cyclin D1 mRNA Pegel. Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Cyclin D1 Veränderungen im Zusammenhang mit der Melanom Progression stehen könnten und von B-RAF und N-RAS Mutationen modifiziert werden und die Cyclin D1 Amplifikation eine prognostische Relevanz beim kutanen Melanom haben könnte.

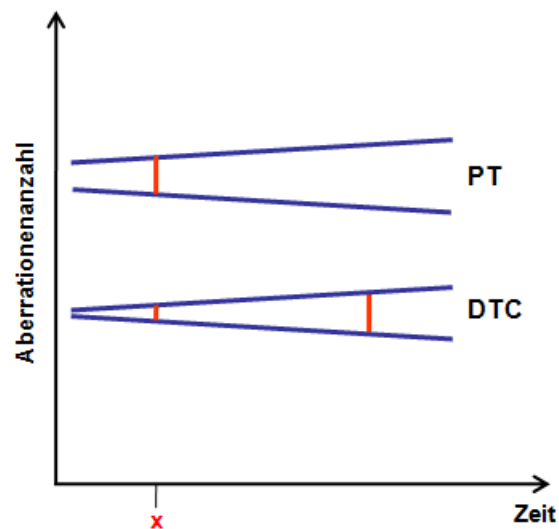
Die zusätzliche Analyse der DTC zeigte, dass in den DTC noch andere Veränderungen bzw. Mutationen geben müssen, die verantwortlich für die Absiedelung sind. Bis jetzt wurden die DTC noch unzureichend auf Mutationen hin untersucht. Die Analyse der DTC ist daher von großem Interesse, da diese Zellen eine Zwischenstufe von Primärtumor und Metastase im systemischen Krankheitsverlauf darstellen (Balch *et al.*, 2009).

### 5.3 Die Analyse der systemischen Progression maligner Melanome

#### Frühe genomische Trennung zwischen Primärtumor und disseminierten Tumoreinzelzellen

Das Ergebnis der hier gewonnenen CGH-Analyse zeigte, wie bereits angesprochen, eine starke Divergenz zwischen PT-Proben und DTC (signifikanter Unterschied zwischen den Deletionen der PT und der DTC). Jedoch kam es zu keinem quantitativen Unterschied zwischen DTC und PT beim Vorkommen von chromosomalen Aberrationen insgesamt (total  $p=0.13$ ; **Abbildung 22 B**; Mann-Whitney-U-Test;  $p$ -Wert two-tailed). Dies ist insofern interessant, weil in den Primärtumoren mindestens 60 % der Zellen die gleiche Aberration aufweisen müssen, damit diese mit der CGH festgestellt werden kann. Deshalb stellt die Gesamtsumme der Veränderungen in einem Primärtumor lediglich den kleinsten gemeinsamen Nenner aller in der Population vorhandenen Veränderungen dar, wohingegen die tatsächliche Anzahl der Veränderungen in einer genetisch instabilen Zellpopulation deutlich höher liegen sollte. Dieser Befund steht in einem Spannungsverhältnis zu dem klassischen Progressionsmodell (lineares), in dem man eine deutlich höhere Anzahl von Veränderungen in den Tumorzellen aus den Lymphknoten erwarten würde. Die DTC erreichen hier erst viel später die gleiche Aberrationenanzahl wie die Primärtumoren. Sie „hinken“ mit ihrer geringen Anzahl an Veränderungen den Primärtumoren „zeitlich“ hinterher (**Abbildung 43**).

Die deutlichen Unterschiede von PT und DTC in der Clusteranalyse legen eine frühzeitige Trennung der genomischen Entwicklungslinien für das Melanom nahe (Scheitler, Hodak eingereicht zur Publikation 2015). Offenkundig akkumulieren die Zellen des Primärtumors und der DTC unabhängig voneinander chromosomale Aberrationen (parallele Progression, s. auch **Abbildung 45**).



**Abbildung 43: Frühe Disseminierung zwischen PT und DTC**

Darstellung der Zunahme von der Aberrationenanzahl in Abhängigkeit von der Zeit zwischen PT und DTC. Die PT haben am Zeitpunkt x mehr Aberrationen, als die DTC. Die DTC erreichen erst später die gleiche Aberrationenanzahl.

Zudem wurden bei nur bei 7/44 (16 %) der DTC-Zellen ein balanciertes CGH-Profil gefunden (16 % aus pN0 und 17 % aus pN1). Das Auftreten von genomischen Veränderungen unterhalb der Auflösungsgrenze der CGH wurde bei den disseminierten Tumoreinzelnzellen von Brustkrebspatienten beobachtet (Schmitt-Kittler *et al.*, 2003). Ein balanciertes CGH-Profil lässt folglich nicht zwingend auf ein unverändertes normales Genom der Zelle schließen. Nach dem derzeitigen Wissensstand müsste also davon ausgegangen werden, dass diese DTC-Zellen wahrscheinlich auch aberrant sein könnten, und es würde sich um sehr früh disseminierte Melanomeinzelnzellen handeln. Deren chromosomale Veränderungen wären für die Progression des malignen Melanoms wichtig zu analysieren (hochauflösenden Array-CGH), da man nur so die genetische Ursache der Absiedelung der DTC (Metastasierung) genauer verifizieren kann.

Im Nachgang wurden diese Zellen in der Studie mit dem Kooperationspartner durch eine hochauflösende Array-CGH untersucht (Ulmer *et al.*, (u.a. Hodak) 2014). Alle 7 DTC-Zellen

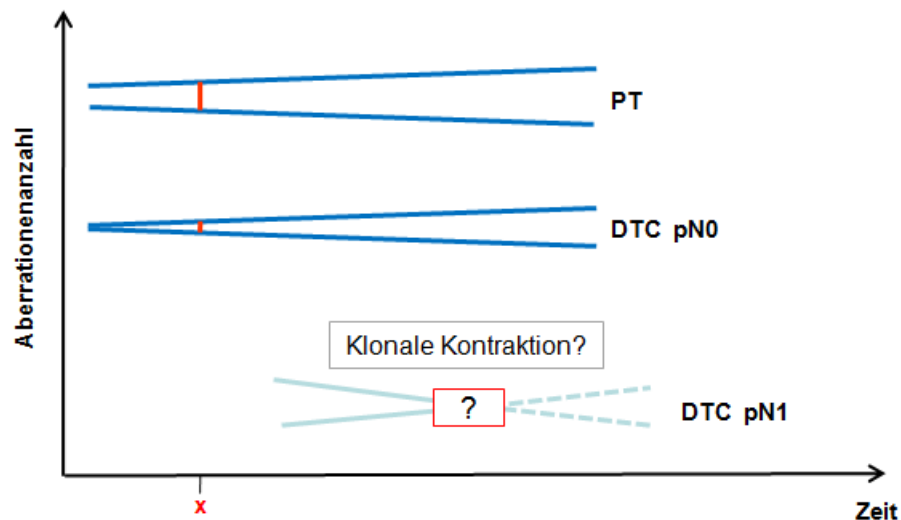
wiesen genomische Veränderungen unterhalb der Auflösungsgrenze der CGH auf und sind somit aberrante, sehr früh disseminierte Melanomeinzelzellen.

### **Spezifische Aberrationen werden mit der Expansion in den Lymphknoten selektiert**

Um zu klären, ob die Aberrationen mit der Zunahme (Expansion) der DTC in den Lymphknoten zunehmen, wurden die DTC in ihren Lymphknotenstatus pN0 und pN1 aufgeteilt und analysiert. Es gab Unterschiede in den genomischen Aberrationen zwischen DTC aus Wächterlymphknoten, die histopathologisch als tumorfrei klassifiziert (pN0) waren, und Tumorzellen, die bereits erfolgreich eine Lymphknotenmetastase gegründet hatten (pN1). Die DTC aus dem pN0-Stadium spiegeln deutlich mehr Amplifikationen wieder. Dagegen haben die DTC aus pN1-Stadium insgesamt deutlich weniger Aberrationen (**Abbildung 18** und **Tabelle 10**). Die auffälligsten Unterschiede liegen in den Chromosomenregionen 1p32pter, 6p, 11qcenq13, 15q22qter, 17p, 17q, 20p, 20q und 22q (**Tabelle 10**). Die CGH-Analysen der DTC zeigten, dass die durchschnittliche Anzahl an Aberrationen pro Tumorzelle mit der Zunahme in den Lymphknoten fällt (DTC pN0: 10 > DTC pN1: 6). Jedoch ist die Fallzahl von den DTC aus pN1 im Vergleich zu den DTC pN0 viel kleiner, um hier eine konkrete Aussage zu machen. Es kam in der mittleren Anzahl der Amplifikationen dennoch zu einem signifikanten Unterschied zwischen den DTC aus pN0 und den DTC aus pN1 ( $p=0.01$ ) und somit zu einem signifikanten Gesamt p-Wert der Aberrationsmittelwerten von  $p\leq 0.05$  (Mann-Whitney-U-Test; p-Wert two-tailed; **Abbildung 19**).

Eine laufende Diskussion befasst sich mit der Ausdehnung der metastatischen Progression im Zusammenhang mit klonaler Selektion und Expansion von Zellen, die spezifische Veränderungen besitzen. Dies führte zu verschiedenen Modellen der metastasierenden Progression (Bernards u. Weinberg, 2002; Weigelt *et al.*, 2005). Die allgemein hohe Frequenz von chromosomalen Aberrationen im Primärtumor und die geringe Frequenz bei den DTC aus pN0 in dieser Arbeit, sowie die Abwesenheit von Aberrationen in melanozytären Nävi (Bauer u. Bastian 2006), könnten darauf hin deuten, dass die pN0 Zellen sich sehr früh von der primären Läsion abgelöst haben. Erst viel später im pN1 Stadium haben dann die DTC annähernd so viele Aberrationen wie der Primärtumor. Daraus kann man schließen, dass die Aberrationen auch hier nicht mit der Zunahme der Zellen im Lymphknoten zunehmen. Die Anzahl an Aberrationen in den DTC nimmt folglich ab, wenn die Tumorlast im Lymphknoten detektierbar wird.





**Abbildung 44: Expansion in den Lymphknoten**

Darstellung der Zunahme von der Aberrationenanzahl in Abhängigkeit von der Zeit zwischen PT, DTC pN0 und DTC pN1.

Demnach könnte sich hier eine klonale Selektion widerspiegeln, da die DTC aus dem pN0-Stadium noch viele Amplifikationen aufweisen, aber im pN1-Stadium diese Bereiche nicht mehr bzw. weniger vorhanden sind (z.b. Chromosomenregion 1p32pter, 1q, 5, 7, 8qcenq23, 12, 16q, 17p und 20; **Tabelle 10**). Die selektierten Bereiche im pN1-Stadium haben demzufolge einen Vorteil für die Expansion in die Lymphknoten (**Abbildung 44**). Interessant hierbei ist der erhöhte Verlust von 9qcenq22 in den DTC aus pN1. Eine Deletion dieser Region stellt offenkundig einen Selektionsvorteil für ein expandierendes Wachstum eines Zellklons dar. Danach scheinen die DTC weitere Veränderungen durchzumachen. Die Metastasen weisen wieder mehr Aberrationen über das gesamte Genom auf, als die DTC (**Tabelle 10**). Jene könnten für die neuen Zielorgane von entscheidender Bedeutung (Metastasenwachstums) sein.

### Genomische Instabilität, Klonalität und zelluläre Tumor-Heterogenität

Die genomische Charakterisierung der 28 untersuchten Primärtumoren sollte Aufschlüsse über Ursprung und Entwicklung der DTC geben. Da aus einigen Tumoren (n=20) mehrere Areale gewonnen wurden (2-4), konnte gleichzeitig in diesen Fällen die Heterogenität des Primärtumors (und Metastasen) selbst untersucht werden. Die vorhandenen chromosomalen Unterschiede zwischen den Tumorarealen legen den Schluss nahe, dass einzelne Areale eines Tumors eine unterschiedliche Tumorentwicklung durchlaufen haben. Die Zellen eines Areals häufen im Laufe der Zeit Aberrationen an, die ihnen einen Selektionsvorteil gegenüber den

anderen Zellen bieten. Diese Hypothese ist gerade beim malignen Melanom plausibel, da die Tumoren häufig in viele verschiedene Gewebe/Organe metastasieren.

Auch bei den Metastasen konnte eine Heterogenität zwischen den Proben festgestellt werden. In Hinblick auf ihre Organ-Herkunft (Haut, LK und Intransit-Filiale) kann man kein krankheitsrelevantes Muster erkennen (**Abbildung 25**).

Die Interpretation von Onkogen-Mutationen in den PT wird durch die Tatsache erschwert, dass die Primärtumoren (und die Metastasen) eine heterogene Ansammlung von verschiedenen Tumor-Zellklonen sind (Klein, 2002 u. 2009; Parisi *et al.*, 2012; Sakaizawa *et al.*, 2012; Greaves und Maley, 2012; Aparicio und Caldas, 2013). Diese Zellklone sind für die sogenannte zelluläre Tumor-Heterogenität verantwortlich. Zelluläre Tumor-Heterogenität in soliden Tumoren ist lange bekannt und wird derzeit sowohl durch genetische und epigenetische Unterschiede zwischen den Zellen erklärt (Cairns *et al.*, 1975). Im Melanom wurde die zelluläre Tumor-Heterogenität auf die Anwesenheit oder Abwesenheit von B-RAF Mutationen beschrieben, aber detaillierte Daten über spezifische Mutationsmuster sind derzeit noch nicht verfügbar (Yancovitz *et al.*, 2012). In der vergleichbaren Studie von Yancovitz *et al.* (2012) wurden korrespondierende Primärtumore und Metastasen aus 18 Patienten auf die B-RAF Mutation (p.V600E) getestet. In 44 % der untersuchten Patienten konnte eine Heterogenität festgestellt werden und in 33 % konnte keine Weitergabe der PT Mutation zur Metastase erkannt werden. Die Metastasen konnten in 11 % alleine eine B-RAF Mutation tragen. In dem hier vorliegenden Melanom Kollektiv konnte auch eine Heterogenität innerhalb eines Patienten bei B-RAF und N-RAS in den Primärtumor-Arealen und Metastasen-Arealen festgestellt werden (**Abbildung 31**). Aber in 75 % der Patienten (mit PT und Met) kam es zu einer Weitergabe der B-RAF Mutation vom Primärtumor zur Metastase. Bei keinem Patienten kam es zu einer Weitergabe der N-RAS Mutationen.

Durch das Hinzufügen der DTC Proben (Triplet-Gruppe; **Abbildung 42**) wurde zusätzlich deutlich, dass die B-RAF Mutation in keine einzige der hier isolierten DTC-Probe der Patienten weitergegeben wurde. Diese Divergenz zwischen PT und Met mit ihren DTC zeigt, wie wichtig die Analyse der DTC ist, da diese Zellen eine anerkannte Zwischenstufe von Primärtumor und Metastase darstellen (AJCC, Balch *et al.*, 2009).

Eine Analyse der Zellen mittels der NGS („next generation of sequencing“) wird zur Zeit in vielen Melanom-Studien verwendet, da man die zelluläre Tumor-Heterogenität auf molekularer Ebene sehr viel ausführlicher untersuchen kann. Eine solche

Sequenzierungsstudie von gepaarten Proben (PT und Met) hat ergeben, dass die Metastasen nur zum Teil wieder auf den Primärtumor zurückzuführen sind (Stratton, 2011). Anhand der hier aufgestellten Schnittmengendarstellung (**Abbildung 17**) wurde außerdem deutlich, dass sich die Primärtumore und die Metastasen deutlich mehr Aberrationen in bestimmten Chromosomenregionen teilen, als die PT mit den DTC oder die Metastasen mit den DTC. Es gab für alle drei Tumortypen keine gemeinsame Chromosomenregion die in über 25 % der Proben verändert auftrat.

Eine aktuelle Studie zum Medulloblastom beschreibt, dass verschiedene Metastasen von demselben Primärtumor organspezifische Mutationsmuster hatten und daher sehr ähnlich zueinander waren, aber sich vom Primärtumor unterscheiden ließen. Die Autoren folgerten daraus, dass die Metastasen aus einer Gruppe von Subklonen des Primärtumors nach klonaler Selektion entstanden waren (Wu *et al.*, 2012). Das gesamte Mutationsvorkommen im Primärtumor und Metastase spiegelt demnach die komplexe klonale Zusammensetzung wieder. Da die Metastasen in dieser Arbeit auf chromosomaler Ebene (CGH-Profil) und Mutationsvorkommen (B-RAF) den Primärtumoren wieder recht ähnlich sehen, bestärkt das Vorkommen einer klonalen Selektion.

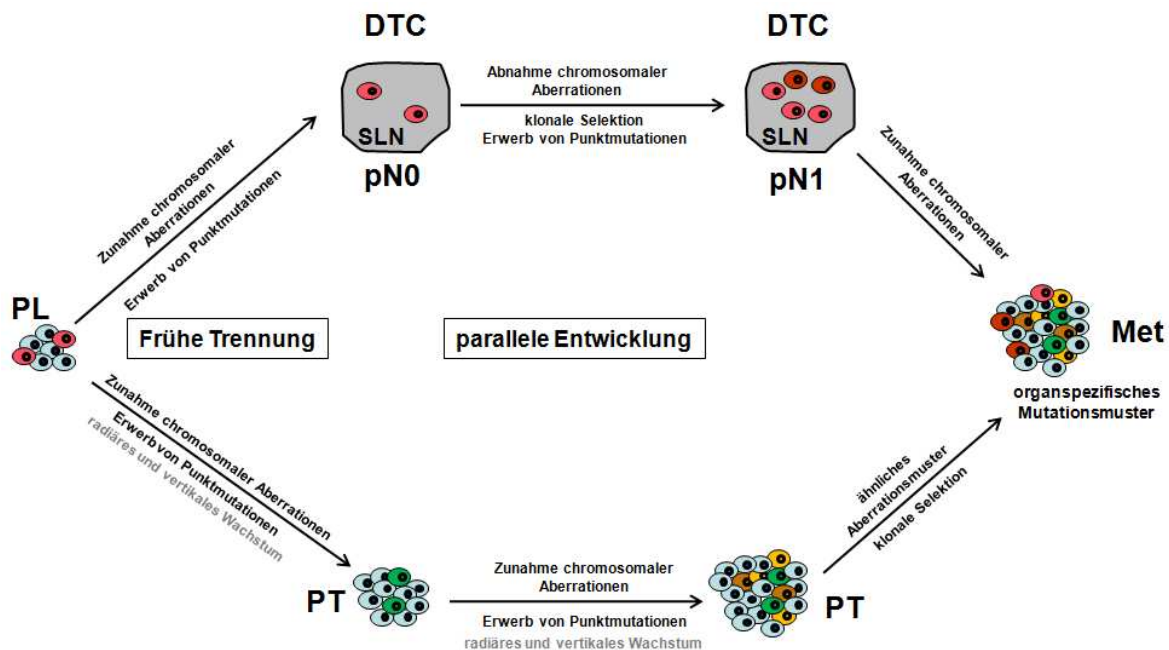
Die Frage, auf welche Art frühe genomische Veränderungen maligner Zellen identifiziert werden können, ist somit weiterhin von großer Wichtigkeit. Für einen direkten Vergleich sollten jedoch Einzelzell-Sequenzierungen verwendet werden.

### **Hypothetisches Progressionsmodell für das maligne Melanom**

Es stellt sich zunehmend heraus, dass solide Tumore häufig früh disseminieren (z.B. Mammakarzinom). Gemeinsamkeiten (veränderte Chromosomenregionen und Mutationsvorkommen von B-RAF und N-RAS) zwischen den drei Tumortypen des malignen Melanoms konnten in diesem Kollektiv nicht gefunden werden. Eine lineare Progression würde verlangen (Kinzler u. Vogelstein, 1996), dass der PT und die DTC viele geteilte Veränderungen aufweisen müssten. Dies ist hier jedoch nicht der Fall. Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf, dass beim Melanom offensichtlich die Mehrheit der Tumorzellen des Primärtumors nicht die Tumorzellen der systemischen Erkrankung darstellen. Was zur Annahme führt, dass die Melanom Tumorzellen früh disseminieren und sich anschließend parallel und unabhängig vom PT zur Fernmetastase entwickeln.

Viele der Ergebnisse müssen zunächst noch mittels einer Probenerhöhung (z. B. von DTC pN1, Met, Triplet-Gruppe) bestätigt und durch höher auflösende Verfahren untersucht werden. Da das Kollektiv aus den Jahren 2002 bis 2005 stammte, wird erst der weitere Krankheitsverlauf der Patienten (z.B. Gewinnung von Metastasen, Überlebensdaten, etc.) eine sichere Aussage über die prognostische Bedeutung der Daten geben können.

Basierend auf den vorliegenden Daten und den momentanen Studien, würde hypothetisch ein paralleles Progressionsmodell für das maligne Melanom sprechen und folgendermaßen (**Abbildung 45**) aussehen (Scheitler, Hodak eingereicht zur Publikation 2015):



**Abbildung 45: Hypothetisches Progressionsmodell zur systemischen Progression maligner Melanome**

Schematische Darstellung eines hypothetischen parallelen Progressionsmodells nach den hier erhobenen Daten. Es kommt zu einer frühen Disseminierung der DTC von der Primärläsion durch die Zunahme chromosomaler Aberrationen und durch den Erwerb von einigen Punktmutationen. Danach folgt parallel und unabhängig die Entwicklung von PT und DTC. Durch die frühe Disseminierung besitzen die DTC, verglichen mit ihren korrespondierenden PT unterschiedliche Aberrationsmuster, sowie einen heterogenen Mutationsstatus (Scheitler, Hodak eingereicht zur Publikation 2015). Bei den DTC kommt es zu einer klonalen Selektion (pN0->pN1) von chromosomalen Regionen innerhalb des Lymphknotens durch die Abnahme chromosomaler Aberrationen und den Erwerb von mehr Punktmutationen. Die Metastasen besitzen ein ähnliches chromosmales Aberrationsmuster und ein organspezifisches Mutationsmuster, sind aber in der Gesamtheit ähnlicher zum PT als zu den DTC. PL=primäre Läsion, DTC=disseminierte Tumor-Einzelzelle, SLN=Wächterlymphknoten, PT=Primärtumor.

### Verwendung der richtigen Zielzellen für die Entwicklung der „molecularly targeted therapies“ sind beim Melanom entscheidend

Bei der Entwicklung so genannter „molecularly targeted therapies“ (zielgerichteten Therapien; s. dazu Einleitung 1.1.4) wird zunehmend versucht, das molekularbiologische Verständnis maligner Erkrankungen als Grundlage zur Entwicklung neuer systemischer Therapien zu nutzen. Es wird momentan davon ausgegangen, dass die gestreuten Zellen den Primärtumoren hinsichtlich der Zielstruktur ähnlich sind. So hat sich mittlerweile etabliert, dass vor der Gabe eines Medikamentes, das an eine molekular definierte Zielstruktur angreift, den Primärtumor daraufhin zu untersuchen. Die dazugehörigen Studien beruhen jedoch nicht auf der Analyse der Zielzellen einer Therapie, das heißt der disseminierten Tumoreinzelzellen. Diese zeigen in dieser Arbeit nur in 4 % der Fälle eine B-RAF Mutation (**Tabelle 16**). So ist es nicht überraschend, dass die adjuvant verabreichten Medikamente in der Hälfte der Melanom-Fälle zu keinem Ansprechen der Patienten führte (Resistenzbildung z.B. gegen die B-RAF Inhibitoren; Daud u. Bastian, 2012), obgleich die Primärtumore das mutierte B-RAF Gen aufwiesen (s. Einleitung 1.1.4). Dieses Phänomen wurde auch beim Mammakarzinom (Schardt *et al.*, 2005; Schmidt-Kittler *et al.*, 2003) und bei anderen untersuchten Tumortypen, wie z.B. das Prostatakarzinom und verschiedenen gastro-intestinalen Tumoren bereits gesehen. Das legt den Schluss nahe, dass Primärtumore alleine ungeeignet sind, genetische Defekte zu identifizieren, die auch in gestreuten Tumorzellen vorkommen. Genomische Veränderungen, die Ansatzpunkte für die Entwicklung adjuvanter und somit Metastasen-vorbeugender Medikamente sind, sollten eher direkt an den Zielzellen dieser Therapien entwickelt werden. Darüber hinaus wird die zelluläre Tumor-Heterogenität, die auch in diesem Kollektiv vorhanden ist, als Hauptursache für Tumor-Rezidiven nach der Behandlung angesehen (Kunz, 2014). Die Aufnahme der DTC zur Einstufung des Tumorstatus in die aktuelle AJCC (Balch *et al.*, 2009), belegt die zunehmende prognostische Bedeutung dieser Einzelzellen als Zwischenstufe der systemischen Progression des Melanoms. Noch dazu konnte in einer Langzeitstudie (2000 - 2008) mit 1027 Patienten und 1834 untersuchten Lymphknoten gezeigt werden, dass der Nachweis von bis zu drei Tumorzellen pro Million Lymphozytenzellen sich signifikant auf das 5-Jahres Überleben der Patienten auswirkte (Ulmer *et al.*, 2014). Eine zusätzliche Analyse der disseminierten Tumoreinzelzellen, wäre für den Behandlungserfolg daher von großer Wichtigkeit.

## 6. Zusammenfassung

Der Prozess der Metastasierung, gerade in der frühen Phase, ist beim malignen Melanom noch unzureichend verstanden. Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, das Auftreten wichtiger genomischer Veränderungen (mit der CGH) und Mutationen in den Onkogenen B-RAF und N-RAS (mit der SSCP) in einen zeitlichen Bezug zur Ausbreitung der systemischen Melanomerkrankung zu setzen. Hierzu wurde eine umfangreiche Probenbank (DNA) aus allen drei Stadien der systemischen Melanomerkrankung (PT, DTC und Met) aufgebaut und untersucht.

Die Ergebnisse der CGH-Untersuchungen zeigten eine starke (teilweise sogar signifikante) Divergenz zwischen Primärtumor-Proben und disseminierten Tumoreinzellen, und legen eine frühzeitige Trennung der genomischen Entwicklungslinien für das Melanom nahe (Scheitler, Hodak eingereicht zur Publikation 2015). Die Anzahl an Aberrationen in den DTC nimmt folglich ab, wenn die Tumorlast im Lymphknoten detektierbar wird (klonale Selektion). Es konnten zudem Chromosomenregionen bestimmt werden, die charakteristisch für die lokale Melanomerkrankung und die systemisch gestreuten Tumorzellen sind, aber auch Veränderungen, die von beiden Tumortypen geteilt werden. Diese Regionen können viele interessante Gene beherbergen, die möglicherweise eine Rolle im Prozess der Disseminierung und Proliferation von Tumorzellen stehen könnten und die Entwicklung neuer adjuvanter Therapien ermöglichen.

Zusätzlich konnte anhand der direkten Ähnlichkeitsanalyse der Proben eines Patienten dargestellt werden, dass eine globale Divergenz zwischen den CGH Veränderungen der DTC und ihrer PT bestand. Dieser Befund widerspricht den klassischen linearen Progressionsmodel, in dem man eine deutlich höhere Anzahl von Veränderungen in den Tumorzellen aus den Lymphknoten erwarten würde. Die Zellen des PT und der DTC akkumulieren unabhängig voneinander chromosomale Aberrationen, was auf eine parallele Progression der Zellen hindeutet.

Insgesamt weisen diese CGH-Ergebnisse daraufhin, dass beim Melanom offensichtlich die Mehrheit der Tumorzellen des Primärtumors nicht die Tumorzellen der systemischen Erkrankung repräsentieren (DTC). Was zur Annahme führte, dass die Melanom-Tumorzellen früh disseminieren und sich anschließend parallel und unabhängig vom PT zur Fernmetastase entwickelten. Basierend auf den vorliegenden Daten und den momentanen Studien, konnte

ein hypothetisches paralleles Progressionsmodell für das maligne Melanom aufgestellt werden (Scheitler, Hodak eingereicht zur Publikation 2015).

Im Zweiten Teil dieser Dissertation konnte für die Mutationsanalyse erfolgreich eine B-RAF- und eine N-RAS-spezifische SSCP-PCR (single strand conformation polymorphism) etabliert werden, mit der man die wichtigsten Mutationen einwandfrei nachweisen konnte. So konnte auch bei den PT/DTC-Paaren eine Divergenz von 81,2 % (zwischen PT und DTC) festgestellt werden, keine Punktmutationen zu teilen. Nach derzeitigem Wissenstand gibt es keine Mutationsstudie zu den DTC aus SLN. So konnten in dieser Arbeit erstmals molekulare Ergebnisse für die DTC des Melanoms aufgezeigt werden. B-RAF und N-RAS Mutationen kommen in den DTC seltener vor als in den PT. Sie sind demnach nicht alleine für die Tumorentstehung verantwortlich. Eine B-RAF Mutation kam vermehrt in DTC aus pN1 Stadium vor und in Melanomen mit vorhandener Ulzeration. Die Korrelation von vorhandener B-RAF Mutation und Ulzeration könnte als Zeichen einer größeren Fähigkeit zur Metastasierung angesehen werden und würde demnach die Überlebensrate von Patienten beeinflussen. Eine zusätzliche quantitative Analyse der DTC für das Cyclin D1 ergab, dass das Cyclin D1 kein „Haupt“-Onkogen in den DTC sein kann. Überdies konnte die Hypothese bestätigt werden, dass sich diese Mutationen aus dem MAPK-Pathway gegenseitig ausschließen.

Des Weiteren konnte in diesem Probenkollektiv eine zelluläre Tumor-Heterogenität und eine genomische Instabilität festgestellt werden, was die Entwicklung neuer molekularen Therapien deutlich erschweren wird und wohl der Grund für die schlechte Ansprechraten der derzeitigen Therapien erklärt.

Da das metastasierende Melanom nach wie vor unheilbar bleibt und viele Patienten auf die derzeit zur Verfügung stehende Therapiekonzepte nicht ansprechen, ist die Entwicklung neuer Therapien von großer Bedeutung. Die Frage, auf welche Art frühe genomische Veränderungen maligner Zellen identifiziert werden können, ist somit weiterhin von großer Wichtigkeit.

Eine Möglichkeit wäre mittels der Array-CGH, welche eine höhere Auflösung als die Metaphasen-CGH besitzt, verstärkt nach weiteren Aberrationen zu suchen. Aus diesen Hybridisierungsexperimenten könnten dann die Regionen bestimmt werden, die charakteristisch für die lokale Melanomerkrankung und die systemisch gestreuten Tumoreinzellen sind. Aber auch Veränderungen, die von beiden Tumorzellgruppen geteilt

werden. Letztere sind aller Voraussicht nach frühzeitig eingetretenen Veränderungen und daher besonders interessant im Hinblick auf die Entwicklung neuer adjuvanter Therapien.



## 7. Literaturverzeichnis

- Adelaide J, Mattei MG, Marics I, Raybaud F, Planche J, De Lapeyriere O, Birnbaum D (1988). **Chromosomal localization of the hst onkogene and its co-amplification with the int.2 oncogene in a human melanoma.** *Oncogene*. Apr;2(4):413-6. PMID: 3283658
- Albino AP, Le Strange R, Oliff AI, Furth ME, Old LJ (1984). **Transforming ras genes from human melanoma: a manifestation of tumour heterogeneity?** *Nature* 308(5954):69-72. PMID: 6700714
- American Melanoma Foundation. **Skin cancer fact sheet.** [www.melanomafoundation.org/facts/statistics.htm](http://www.melanomafoundation.org/facts/statistics.htm); Stand Juli 2014.
- Anforth RM, Blumetti TC, Kefford RF, Sharma R, Scolyer RA, Kossard S, Long GV, Fernandez-Peñas P (2012). **Cutaneous manifestations of dabrafenib (GSK2118436): a selective inhibitor of mutant BRAF in patients with metastatic melanoma.** *Br J Dermatol*. 2012 Nov;167(5):1153-60. PMID: 22804352
- Aparicio S, Caldas C. **The implications of clonal genome evolution for cancer medicine** (2013). *N Engl J Med*. Feb 28;368(9):842-51. PMID: 23445095
- Ascierto PA, Schadendorf D, Berking C, Agarwala SS, van Herpen CM, Queirolo P, Blank CU, Hauschild A, Beck JT, St-Pierre A, Niazi F, Wandel S, Peters M, Zubel A, Dummer R (2013). **MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study.** *Lancet Oncol*. 2013 Mar;14(3):249-56. PMID: 23414587
- Avery-Kiejda KA, Bowden NA, Croft AJ, Scurr LL, Kairupan CF, Ashton KA, Talseth-Palmer BA, Rizos H, Zhang XD, Scott RJ, Hersey P (2011). **P53 in human melanoma fails to regulate target genes associated with apoptosis and the cell cycle and may contribute to proliferation.** *BMC Cancer*. May 27;11:203. PMID: 21615965
- Balázs M, Adám Z, Treszl A, Bégány A, Hunyadi J, Adány R (2001). **Chromosomal imbalances in primary and metastatic melanomas revealed by comparative genomic hybridization.** *Cytometry*. Aug 15;46(4):222-32. PMID:11514955
- Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A, Jr., Kirkwood JM, Mc-Masters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF (2001a). **Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma.** *J Clin Oncol*. Aug 15;19(16):3635-48. PMID: 11504745
- Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC, Jr., Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK (2009). **Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification.** *J Clin Oncol*. Dec 20;27(36):6199-206. PMID: 19917835
- Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, McMasters KM, Ross MI, Kirkwood JM, Atkins MB, Thompson JA, Coit DG, Byrd D, Desmond R, Zhang Y, Liu PY, Lyman GH, Morabito A (2001b). **Prognostic Factors Analysis of 17,600 Melanoma Patients: Validation of the American Joint Committee on Cancer Melanoma Staging System.** *J Clin Oncol*. Aug 15;19(16):3622-34. PMID: 11504744
- Balch, C. M. (1992). **Cutaneous melanoma: prognosis and treatment results worldwide.** *Semin Surg Oncol*. Nov-Dec;8(6):400-14. PMID: 1439450

## 7. Literaturverzeichnis

---

- Bastian BC (2003). **Understanding the progression of melanocytic neoplasia using genomic analysis: from fields to cancer.** *Oncogene*. May 19;22(20):3081-6. PMID: 12789284
- Bastian BC, LeBoit PE, Hamm H, Bröcker EB, Pinkel D (1998). **Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization.** *Cancer Res*. May 15;58(10):2170-5. PMID: 9605762
- Bauer J, Bastian BC (2006). **Distinguishing melanocytic nevi from melanoma by DNA copy number changes: comparative genomic hybridization as a research and diagnostic tool.** *Dermatol Ther*. Jan-Feb;19(1):40-9. PMID: 16405569
- Bauer J, Curtin JA, Pinkel D, Bastian BC (2007). **Congenital melanocytic nevi frequently harbor NRAS mutations but no BRAF mutations.** *J Invest Dermatol* 127:179–182 PMID: 16888631
- Bennett, D. C. (2003). **Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes.** *Oncogene*. May 19;22(20):3063-9. PMID: 12789281
- Bernards R, Weinberg RA (2002). **A progression puzzle.** *Nature* Aug 22;418(6900):823. PMID:12192390
- Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA (2009). Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology (Williston Park)*. May;23(6):488-96. PMID: 19544689
- Bollag G, Hirth P, Tsai J, Zhang J, Ibrahim PN, Cho H, Spevak W, Zhang C, Zhang Y, Habets G, Burton EA, Wong B, Tsang G, West BL, Powell B, Shellooe R, Marimuthu A, Nguyen H, Zhang KY, Artis DR, Schlessinger J, Su F, Higgins B, Iyer R, D'Andrea K, Koehler A, Stumm M, Lin PS, Lee RJ, Grippo J, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, Chapman PB, Flaherty KT, Xu X, Nathanson KL, Nolop K (2010). **Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma.** *Nature*. 2010 Sep 30;467(7315):596-9. PMID: 20823850
- Breitbart EW, Waldmann A, Nolte S, Capellaro M, Greinert R, Volkmer B, Katalinic A (2012). **Systematic skin cancer screening in Northern Germany.** *J Am Acad Dermatol*. Feb;66(2):201-11. PMID: 22074699
- Breslow A (1970). **Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma.** *Ann Surg*. Nov;172(5):902-8. PMID: 5477666
- Breslow A (1977). **Problems in the measurement of tumor thickness and level of invasion in cutaneous melanoma.** *Hum Pathol*. Jan;8(1):1-2. PMID: 844850
- Broekaert SM, Roy R, Okamoto I, van den Oord J, Bauer J, Garbe C, Barnhill RL, Busam KJ, Cochran AJ, Cook MG, Elder DE, McCarthy SW, Mihm MC, Schadendorf D, Scolyer RA, Spatz A, Bastian BC (2010). **Genetic and morphologic features for melanoma classification.** *Pigment Cell Melanoma Res*. Dec;23(6):763-70. PMID: 20874733
- Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, Einhorn E, Herlyn M, Minna J, Nicholson A, Roth JA, Albelda SM, Davies H, Cox C, Brignell G, Stephens P, Futreal PA, Wooster R, Stratton MR, Weber BL (2002). **BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma.** *Cancer Res*. Dec 1;62(23):6997-7000. PMID: 12460918
- Cairns J (1975). **Mutation selection and the natural history of cancer.** *Nature* May 15;255(5505):197-200. PMID: 1143315

## 7. Literaturverzeichnis

---

- Carr J, Mackie RM (1994). **Point mutations in the N-ras oncogene in malignant melanoma and congenital naevi.** *Br J Dermatol.* Jul;131(1):72-7. PMID: 8043423
- Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, Chapman PB, Roman RA, Teitcher J, Panageas KS, Busam KJ, Chmielowski B, Lutzky J, Pavlick AC, Fusco A, Cane L, Takebe N, Vemula S, Bouvier N, Bastian BC, Schwartz GK (2011). **KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma.** *JAMA.* Jun 8;305(22):2327-34. PMID: 21642685
- Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur AG, Study Group (2011). **Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation.** *N.Engl.J.Med.* 364: 2507-16. PMID: 21639808
- Cho NY, Choi M, Kim BH, Cho YM, Moon KC, Kang GH (2006). **BRAF and KRAS mutations in prostatic adenocarcinoma.** *Int J Cancer.* Oct 15;119(8):1858-62. PMID: 16721785
- Clark WH Jr (1991b). **Tumour progression and the nature of cancer.** *Br J Cancer.* Oct;64(4):631-44. PMID:1911211
- Clark WH Jr (1991a). **Human cutaneous malignant melanoma as a model for cancer.** *Cancer Metastasis Rev.* Jun;10(2):83-8. PMID:1873857
- Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M (1984). **A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma.** *Hum Pathol.* Dec;15(12):1147-65. PMID:6500548
- Clark WH Jr, Evans HL, Everett MA, Farmer ER, Graham JH, Mihm MC Jr, Rosai J, Sagebiel RW, Wick MR (1991b). **Early melanoma. Histologic terms.** *Am. J. Dermatopathol.* 13, 579-582. PMID:1805653
- Clark WH Jr, Mihm MC Jr. (1969b) **Lentigo maligna and lentigo-maligna melanoma.** *Am J Pathol.* 1969 Apr;55(1):39-67. PMID: 5776171
- Clark WH, Jr., From L, Bernardino EA, Mihm MC (1969a) **The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin.** *Cancer Res.* Mar;29(3):705-27. PMID: 5773814
- Cohen C, Zavala-Pompa A, Sequeira JH, Shoji M, Sexton DG, Cotsonis G, Cerimele F, Govindarajan B, Macaron N, Arbiser JL (2002). **Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression.** *Clin Cancer Res.* Dec;8(12):3728-33. PMID: 12473582
- Cooper PH, Wanebo HJ, Hagar RW (1985). **Regression in thin malignant melanoma. Microscopic diagnosis and prognostic importance.** *Arch Dermatol.* Sep;121(9):1127-31. PMID: 4037837
- Cruz F 3rd, Rubin BP, Wilson D, Town A, Schroeder A, Haley A, Bainbridge T, Heinrich MC, Corless CL (2003). **Absence of BRAF and NRAS mutations in uveal melanoma.** *Cancer Res.* Sep 15;63(18):5761-6. PMID: 14522897
- Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Bröcker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC (2005). **Distinct sets of genetic alterations in melanoma.** *N Engl J Med.* Nov 17;353(20):2135-47. PMID: 16291983

## 7. Literaturverzeichnis

---

- Czajkowski R, Placek W, Drewa G, Czajkowska A, Uchańska G (2004). **FAMMM syndrome: pathogenesis and management.** *Dermatol. Surg.* 30, 291-296. PMID: 14871223
- Dahl C, Guldberg P (2007). **The genome and epigenome of malignant melanoma.** *APMIS.* Oct;115(10):1161-76. PMID: 18042149
- Daud A, Bastian BC (2012). **Beyond BRAF in melanoma.** *Curr Top Microbiol Immunol.* ;355:99-117. PMID: 21826607
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA (2002). **Mutations of the BRAF gene in human cancer.** *Nature.* Jun 27;417(6892):949-54. PMID: 12068308
- Dong J, Phelps RG, Qiao R, Yao S, Benard O, Ronai Z, Aaronson SA (2003). **BRAF oncogenic mutations correlate with progression rather than initiation of human melanoma.** *Cancer Res.* Jul 15;63(14):3883-5. PMID: 12873977
- Downward J (2003). **Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy.** *Nat Rev Cancer.* Jan;3(1):11-22. PMID: 12509763
- Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL (2001). **Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia.** *N Engl J Med.* Apr 5;344(14):1031-7. PMID: 11287972
- du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schröck E, Popp S, Döhner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P, Cremer T (1993). **Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization.** *Hum Genet.* Feb;90(6):590-610. PMID: 8444465
- Dutton-Regester K, Hayward NK (2012). **Whole genome and exome sequencing of melanoma: a step toward personalized targeted therapy.** *Adv Pharmacol.* 2012;65:399-435. PMID: 22959033
- Eggermont AM, Robert C (2011). **New drugs in melanoma: it's a whole new world.** *Eur.J.Cancer* 47: 2150-7. PMID: 21802280
- Eggermont AM, Schadendorf D (2009). **Melanoma and immunotherapy.** *Hematol Oncol Clin North Am.* 23(3):547-564. ix-x. PMID: 19464602
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D (1998). **Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns.** *Proc Natl Acad Sci USA.* Dec 8;95(25):14863-8. PMID: 9843981
- Elder DE, Clark WH Jr, Elenitsas R, Guerry D 4th, Halpern AC (1993). **The early and intermediate precursor lesions of tumor progression in the melanocytic system: common acquired nevi and atypical (dysplastic) nevi.** *Semin Diagn Pathol.* Feb;10(1):18-35. PMID: 8506414
- Elder DE, Jucovy PM, Tuthill RJ, Clark WH, Jr (1980). **The classification of malignant melanoma.** *Am J Dermatopathol.* Winter;2(4):315-20. PMID: 7468934
- Epstein JH. (1978). **Photocarcinogenesis: a review.** *Natl Cancer Inst Monogr.* Dec;(50):13-25. PMID: 381936

## 7. Literaturverzeichnis

---

- Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB (2010). **Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma.** *N Engl J Med.* Aug 26;363(9):809-19. PMID: 20818844
- Friday BB, Adjei AA (2008). **Advances in targeting the Ras/Raf/MEK/Erk mitogen-activated protein kinase cascade with MEK inhibitors for cancer therapy.** *Clin Cancer Res.* 14:342-346. PMID: 18223206
- Garbe C (2006). **Management des Melanoms.** Springer Medizin Verlag Heidelberg ISBN-10: 3540289879
- Garbe C, Blum A (2001). **Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide.** *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* Sep-Oct;14(5):280-90. PMID: 11586069
- Garbe C, Buttner P, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, Guggenmoos-Holzmänn I, Lechner W, Lippold A, Orfanos CE (1995). **Primary cutaneous melanoma. Prognostic classification of anatomic location.** *Cancer.* May 15;75(10):2492-8. PMID: 7736393
- Garbe C, Schadendorf D, Stolz W, Volkenandt M, Reinhold U, Kortmann R-D, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A, Kaufmann R and Hauschild A (2008). **Kurzleitlinie - Malignes Melanom der Haut (ICD10 C43).** JDDG Volume 6. Blackwell Verlag, Berlin
- Garbe C, Weiss J, Kruger S, Garbe E, Buttner P, Bertz J, Hoffmeister H, Guggenmoos-Holzmänn I, Jung EG, Orfanos CE (1993). **The German melanoma registry and environmental risk factors implied.** *Recent Results Cancer Res.* 128:69-89. PMID: 8356335
- Gorden A, Osman I, Gai W, He D, Huang W, Davidson A, Houghton AN, Busam K, Polsky D (2003). **Analysis of BRAF and N-RAS mutations in metastatic melanoma tissues.** *Cancer Res.* Jul 15;63(14):3955-7. PMID: 12873990
- Gray-Schopfer VC, da Rocha Dias S, Marais R (2005). **The role of B-RAF in melanoma.** *Cancer Metastasis Rev.* Jan;24(1):165-83. PMID: 15785879
- Greaves M, Maley CC (2012). **Clonal evolution in cancer.** *Nature.* Jan 18;481(7381):306-13. PMID: 22258609
- Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgleish GL, Hunter C, Bignell G, Davies H, Teague J, Butler A, Stevens C, Edkins S, O'Meara S, Vastrik I, Schmidt EE, Avis T, Barthorpe S, Bhamra G, Buck G, Choudhury B, Clements J, Cole J, Dicks E, Forbes S, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Hinton J, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Tofts C, Varian J, Webb T, West S, Widaa S, Yates A, Cahill DP, Louis DN, Goldstraw P, Nicholson AG, Brasseur F, Looijenga L, Weber BL, Chiew YE, DeFazio A, Greaves MF, Green AR, Campbell P, Birney E, Easton DF, Chenevix-Trench G, Tan MH, Khoo SK, Teh BT, Yuen ST, Leung SY, Wooster R, Futreal PA, Stratton MR (2007). **Patterns of somatic mutation in human cancer genomes.** *Nature.* Mar 8;446(7132):153-8. PMID: 17344846
- Griewank KG, Scolyer RA, Thompson JF, Flaherty KT, Schadendorf D, Murali R (2014). **Genetic alterations and personalized medicine in melanoma: progress and future prospects.** *J Natl Cancer Inst.* 2014 Feb;106(2):djt435. PMID: 24511108
- Hagemann, C. u. Rapp, U. R. (1999). **Isotype-specific functions of Raf kinases.** *Exp Cell Res.* Nov 25;253(1):34-46. PMID: 10579909
- Hanahan D, Weinberg RA (2000). **The hallmarks of cancer.** *Cell.* Jan 7;100(1):57-70. PMID: 10647931

## 7. Literaturverzeichnis

---

- Hauschild A, Agarwala SS, Trefzer U, Hogg D, Robert C, Hersey P, Eggermont A, Grabbe S, Gonzalez R, Gille J, Peschel C, Schadendorf D, Garbe C, O'Day S, Daud A, White JM, Xia C, Patel K, Kirkwood JM, Keilholz U (2009). **Results of a phase III, randomized, placebo-controlled study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel as second-line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma.** *J Clin Oncol.* 27(17):2823–2830. PMID: 19349552
- Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, Rutkowski P, Blank CU, Miller WH Jr, Kaempgen E, Martín-Algarra S, Karaszewska B, Mauch C, Chiarion-Sileni V, Martin AM, Swann S, Haney P, Mirakhur B, Guckert ME, Goodman V, Chapman PB (2012). **Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial.** *Lancet.* Jul 28;380(9839):358-65. PMID: 22735384
- Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, Rutkowski P, Blank CU, Miller WH, Jr., Kaempgen E, Martin-Algarra S, Karaszewska B, Mauch C, Chiarion-Sileni V, Martin AM, Swann S, Haney P, Mirakhur B, Guckert ME, Goodman V, Chapman PB (2012). **Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial.** *Lancet.* 380: 358-65. PMID: 22735384
- Herlyn M, Clark WH, Rodeck U, Mancianti ML, Jambrosic J and Koprowski H (1987). **Biology of tumor progression in human melanocytes.** *Lab Invest* 56, 461-474. PMID: 3553733
- Herlyn M, Rodeck U, Mancianti M, Cardillo FM, Lang A, Ross AH, Jambrosic J, Koprowski H (1987b). **Expression of melanoma-associated antigens in rapidly dividing human melanocytes in culture.** *Cancer Res.* Jun 15;47(12):3057-61. PMID: 3034401
- Hilger RA, Scheulen ME, Strumberg D (2002). **The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer.** *Onkologie.* Dec;25(6):511-8. PMID: 12566895
- Hingorani SR, Jacobetz MA, Robertson GP, Herlyn M, Tuveson DA (2003). **Suppression of BRAF(V599E) in human melanoma abrogates transformation.** *Cancer Res.* Sep 1;63(17):5198-202. PMID: 14500344
- Houben R, Becker JC, Kappel A, Terheyden P, Bröcker EB, Goetz R, Rapp UR (2004). **Constitutive activation of the RAS-RAF signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis.** *J Carcinog.* 3(1):6. PMID: 15046639
- Houben R, Hesbacher S, Schmid CP, Kauczok CS, Flohr U, Haferkamp S, Müller CS, Schrama D, Wischhusen J, Becker JC (2011). **High-level expression of wild-type p53 in melanoma cells is frequently associated with inactivity in p53 reporter gene assays.** *PLoS One.* 6(7):e22096. PMID: 21760960
- Houghton AN and Polsky D (2002). **Focus on melanoma.** *Cancer Cell.* Oct;2(4):275-8. PMID: 12398891
- Huntington JT, Shields JM, Der CJ, Wyatt CA, Benbow U, Slingluff CL Jr, Brinckerhoff CE (2004). **Overexpression of collagenase 1 (MMP-1) is mediated by the ERK pathway in invasive melanoma cells: role of BRAF mutation and fibroblast growth factor signaling.** *J Biol Chem.* Aug 6;279(32):33168-76. PMID: 15184373
- ISCN, 1995 – **An international System for Human Cytogenetic Nomenclature 1995.** Felix Mitelman (ed) S. Karger Verlag, Basel
- Jeck WR, Parker J, Carson CC, Shields JM, Sambade MJ, Peters EC, Burd CE, Thomas NE, Chiang DY, Liu W, Eberhard DA, Ollila D, Grilley-Olson J, Moschos S, Neil Hayes D, Sharpless NE (2014). **Targeted next**

## 7. Literaturverzeichnis

---

- generation sequencing identifies clinically actionable mutations in patients with melanoma.** *Pigment Cell Melanoma Res.* Jul;27(4):653-63. PMID: 24628946
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992). **Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors.** *Science.* Oct 30;258(5083):818-21. PMID: 1359641
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1993). **Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors.** *Semin Cancer Biol.* 1993 Feb;4(1):41-6 PMID: 8448377
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D (1994). **Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors.** *Genes Chromosomes Cancer.* 1994 Aug;10(4):231-43. PMID: 7522536
- Kang S, Barnhill RL, Mihm MC, Jr., Sober AJ (1993). **Histologic regression in malignant melanoma: an interobserver concordance study.** *J Cutan Pathol.* Apr;20(2):126-9. PMID: 8320356
- Karasarides M, Chioleches A, Hayward R, Niculescu-Duvaz D, Scanlon I, Friedlos F, Ogilvie L, Hedley D, Martin J, Marshall CJ, Springer CJ, Marais R (2004). **B-Raf is a therapeutic target in melanoma.** *Oncogene.* Aug 19;23(37):6292-8. PMID: 15208680
- Karbowiczek M, Spittle CS, Morrison T, Wu H, Henske EP (2008). **mTOR is activated in the majority of malignant melanomas.** *J Invest Dermatol.* Apr;128(4):980-7. PMID: 17914450
- Kefford R, Bishop JN, Tucker M, Bressac-de Paillerets B, Bianchi-Scarrá G, Bergman W, Goldstein A, Puig S, Mackie R, Elder D, Hansson J, Hayward N, Hogg D, Olsson H; Melanoma Genetics Consortium (2002). **Genetic testing for melanoma.** *Lancet Oncol.* Nov;3(11):653-4. PMID: 12424065
- Kelly JW, Sagebiel RW, Blois MS (1985). **Regression in malignant melanoma. A histologic feature without independent prognostic significance.** *Cancer.* Nov 1;56(9):2287-91. PMID: 4052972
- Kim KB, Kefford R, Pavlick AC, Infante JR, Ribas A, Sosman JA, Fecher LA, Millward M, McArthur GA, Hwu P, Gonzalez R, Ott PA, Long GV, Gardner OS, Ouellet D, Xu Y, DeMarini DJ, Le NT, Patel K, Lewis KD (2013). **Phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor Trametinib in patients with metastatic BRAF-mutant cutaneous melanoma previously treated with or without a BRAF inhibitor.** *J Clin Oncol.* 2013 Feb 1;31(4):482-9. PMID: 23248257
- Kinzler KW, Vogelstein B (1996). **Life and death in a malignant tumour.** *Nature.* 1996 Jan 4;379(6560):19-20. PMID: 8538735
- Klein CA (2009). **Parallel progression of primary tumours and metastases.** *Nat Rev Cancer.* Apr;9(4):302-12. PMID: 19308069
- Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH, Riethmüller G (2002). **Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer.** *Lancet.* Aug 31;360(9334):683-9. PMID: 12241875
- Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmüller G. (1999). **Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells.** *Proc Natl Acad Sci USA.* Apr 13;96(8):4494-9. PMID: 10200290

## 7. Literaturverzeichnis

---

- Korn EL, Liu PY, Lee SJ, Chapman JA, Niedzwiecki D, Suman VJ, Moon J, Sondak VK, Atkins MB, Eisenhauer EA, Parulekar W, Markovic SN, Saxman S, Kirkwood JM (2008). **Meta-analysis of Phase II cooperative group trials in metastatic stage IV melanoma to determine progression-free and overall survival benchmarks for future Phase II trials.** *J Clin Oncol.* Feb 1;26(4):527-34. PMID: 18235113
- Kumar R, Angelini S, Hemminki K (2003). **Activating BRAF and N-Ras mutations in sporadic primary melanomas: an inverse association with allelic loss on chromosome 9.** *Oncogene.* Dec 18;22(58):9217-24. PMID: 14681681
- Kunz M (2014). **Oncogene in melanoma: An update.** *Eur J Cell Biol.* Jan-Feb;93(1-2):1-10. PMID: 24468268
- Lang J and MacKie RM (2005). **Prevalence of exon 15 BRAF mutations in primary melanoma of the superficial spreading, nodular, acral, and lentigo maligna subtypes.** *J Invest Dermatol.* Sep;125(3):575-9. PMID: 16117801
- Linos E, Swetter SM, Cockburn MG et al (2009). **Increasing burden of melanoma in the United States.** *J Invest Dermatol* 129:1666–1674. PMID: 19131946
- Long, G.V., Menzies, A.M., Nagrial, A.M., Haydu, L.E., Hamilton, A.L., Mann, G.J., Hughes, T.M., Thompson, J.F., Scolyer, R.A., and Kefford, R.F. (2011). **Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma.** *J Clin Oncol* 29, 1239-1246. PMID: 21343559
- Lopansri S, Mihm MC Jr. Clinical and pathological correlation of malignant melanoma. *J Cutan Pathol.* 1979 Jun;6(3):180-94. PMID: 479437
- Mao JH, Kim IJ, Wu D, Climent J, Kang HC, DelRosario R, Balmain A (2008). **FBXW7 targets mTOR for degradation and cooperates with PTEN in tumor suppression.** *Science.* Sep 12;321(5895):1499-502. PMID: 18787170
- Marais R, Light Y, Paterson HF, Mason CS, Marshall CJ (1997). **Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases.** *J Biol Chem.* Feb 14;272(7):4378-83. PMID: 9020159
- Marks R (2002). **The changing incidence and mortality of melanoma in Australia.** *Recent Results Cancer Res* 160: 113–121 PMID: 12079205
- McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Lee JT, Chang F, Bertrand FE, Navolanic PM, Terrian DM, Franklin RA, D'Assoro AB, Salisbury JL, Mazzarino MC, Stivala F, Libra M (2006). **Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance.** *Adv Enzyme Regul.* 46:249-279. PMID: 16854453
- McGovern VJ, Cochran AJ, Van der Esch EP, Little JH, MacLennan R (1986). **The classification of malignant melanoma, its histological reporting and registration: a revision of the 1972 Sydney classification.** *Pathology* 18:12–21 PMID: 3725419
- McGovern VJ, Mihm MC, Jr., Bailly C, Booth JC, Clark WH, Jr., Cochran AJ, Hardy EG, Hicks JD, Levene A, Lewis MG, Little JH, Milton GW (1973). **The classification of malignant melanoma and its histologic reporting.** *Cancer.* Dec;32(6):1446-57. PMID: 4757934
- Meier F, Schitteck B, Busch S, Garbe C, Smalley K, Satyamoorthy K, Li G, Herlyn M (2005). **The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signalling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma.** *Front Biosci.* Sep 1;10:2986-3001. PMID: 15970553



## 7. Literaturverzeichnis

---

- Meier F, Will S, Ellwanger U, Schlagenhauß B, Schittek B, Rassner G, Garbe C (2002). **Metastatic pathways and time courses in the orderly progression of cutaneous melanoma.** *Br J Dermatol.* Jul;147(1):62-70. PMID: 12100186
- Menzies AM, Long GV, Murali R (2012). **Dabrafenib and its potential for the treatment of metastatic melanoma.** *Drug Des Devel Ther.* 6:391-405. PMID: 23251089
- Morton DL, Chan AD (1999a). **Current status of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma : is it standard of care?** *J Am Coll Surg.* Aug;189(2):214-23. PMID: 10437845
- Morton DL, Chan AD (2000). **The concept of sentinel node localization: how it started.** *Semin Nucl Med.* Jan;30(1):4-10. PMID: 10656238
- Morton DL, Cochran AJ, Thompson JF, Elashoff R, Essner R, Glass EC, Mozzillo N, Nieweg OE, Roses DF, Hoekstra HJ, Karakousis CP, Reintgen DS, Coventry BJ, Wang HJ (2005). **Sentinel node biopsy for early-stage melanoma: accuracy and morbidity in MSLT-I, an international multicenter trial.** *Ann Surg.* Sep;242(3):302-1. PMID: 16135917
- Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, Elashoff R, Essner R, Nieweg OE, Roses DF, Hoekstra HJ, Karakousis CP, Reintgen DS, Coventry BJ, Glass EC, Wang HJ; MSLT Group (2006). **Sentinel-Node Biopsy or Nodal Observation in Melanoma.** *N Engl J Med.* Sep 28;355(13):1307-17. PMID: 17005948
- Morton DL, Thompson JF, Essner R, Elashoff R, Stern SJ, Nieweg OE, Roses DF, Karakousis CP, Mozzillo N, Reintgen D, Wang HJ, Glass EC, Cochran AJ (1999b). **Validation of the accuracy of intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for early stage melanoma: a multicenter trial. Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial Group.** *Ann Surg.* Oct;230(4):453-63; discussion 463-5. PMID: 10522715
- Namiki T, Yanagawa S, Izumo T, Ishikawa M, Tachibana M, Kawakami Y, Yokozeki H, Nishioka K, Kaneko Y (2005). **Genomic alterations in primary cutaneous melanomas detected by metaphase comparative genomic hybridization with laser capture or manual microdissection: 6p gains may predict poor outcome.** *Cancer Genet Cytogenet.* 2005 Feb;157(1):1-11. PMID: 15676140
- Neagu M, Constantin C, Tanase C (2010). **Immune-related biomarkers for diagnosis/prognosis and therapy monitoring of cutaneous melanoma.** *Expert Rev Mol Diagn.* Oct;10(7):897-919. PMID: 20964610
- Nikolaev SI, Rimoldi D, Iseli C, Valsesia A, Robyr D, Gehrig C, Harshman K, Guipponi M, Bukach O, Zoete V, Michielin O, Muehlethaler K, Speiser D, Beckmann JS, Xenarios I, Halazonetis TD, Jongeneel CV, Stevenson BJ, Antonarakis SE (2011). **Exome sequencing identifies recurrent somatic MAP2K1 and MAP2K2 mutations in melanoma.** *Nat Genet.* Dec 25;44(2):133-9. PMID: 22197931
- Omholt K, Karsberg S, Platz A, Kanter L, Ringborg U, Hansson J (2002). **Screening of N-ras codon 61 mutations in paired primary and metastatic cutaneous melanomas: mutations occur early and persist throughout tumor progression.** *Clin Cancer Res.* Nov;8(11):3468-74. PMID: 12429636
- Omholt K, Platz A, Kanter L, Ringborg U, Hansson J (2003). **NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression.** *Clin Cancer Res.* Dec 15;9(17):6483-8. PMID: 14695152

## 7. Literaturverzeichnis

---

- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989). **Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr;86(8):2766-70. PMID: 2565038
- Pages G, Lenormand P, L'Allemain G, Chambard JC, Meloche S, Pouyssegur J (1993). **Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 15;90(18):8319-23. PMID: 8397401
- Parisi F, Micsinai M, Strino F, Ariyan S, Narayan D, Bacchiocchi A, Cheng E, Xu F, Li P, Kluger H, Halaban R, Kluger Y (2012). **Integrated analysis of tumor samples sheds light on tumor heterogeneity.** *Yale J Biol Med.* Sep;85(3):347-61. PMID: 23012583
- Peyssonnaud C, Eychène A (2001). **The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation.** *Biol Cell.* Sep;93(1-2):53-62. PMID: 11730323
- Pinkel D, Albertson DG (2005). **Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer.** *Nat Genet.* 2005 Jun;37 Suppl:S11-7. PMID: 15920524
- Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, Moses TY, Hostetter G, Wagner U, Kakareka J, Salem G, Pohida T, Heenan P, Duray P, Kallioniemi O, Hayward NK, Trent JM, Meltzer PS (2003). **High frequency of BRAF mutations in nevi.** *Nat Genet.* Jan;33(1):19-20. PMID: 12447372
- Poynter JN, Elder JT, Fullen DR, Nair RP, Soengas MS, Johnson TM, Redman B, Thomas NE, Gruber SB (2006). **BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi.** *Melanoma Res.* Aug;16(4):267-73. PMID: 16845322
- Prichard C, Carragher L, Aldridge V, Giblett S, Jin H, Foster C, Andreadi C, Kamata T. (2007). **Mouse models for BRAF-induced cancers.** *Biochem Soc Trans.* 35:1329-1333. PMID: 17956344
- Reifenberger J, Knobbe CB, Sterzinger AA, Blaschke B, Schulte KW, Ruzicka T, Reifenberger G (2004). **Frequent alterations of Ras signaling pathway genes in sporadic malignant melanomas.** *Int J Cancer.* Apr 10;109(3):377-84. PMID: 14961576
- Robert Koch Institut 2004
- Robert Koch Institut 2012
- Rodolfo M, Daniotti M, Vallacchi V (2004). **Genetic progression of metastatic melanoma.** *Cancer Lett.* Oct 28;214(2):133-47. PMID: 15363539
- Rosenthal A, Coutelle O, Craxton M (1993). **Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR.** *Nucleic Acids Res.* Jan 11;21(1):173-4. PMID: 8441614
- S3 Leitlinie Melanom Kurzversion 1.0 (2013). **Malignes Melanom: S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms.** *Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V.*
- Sakaizawa K, Goto Y, Kuniwa Y, Uchiyama A, Harada K, Shimada S, Saida T, Ferrone S, Takata M, Uhara H, Okuyama R (2012). **Mutation analysis of BRAF and KIT in circulating melanoma cells at the single cell level.** *Br J Cancer.* Feb 28;106(5):939-46. PMID: 22281663
- Saldanha G, Potter L, DaForno P, Pringle JH (2006). **Cutaneous melanoma subtypes show different BRAF and NRAS mutation frequencies.** *Clin Cancer Res.* Aug 1;12(15):4499-505. PMID: 16899595

## 7. Literaturverzeichnis

---

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1992). **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** 1997. *Biotechnology.* 24:104-8. PMID: 1422003
- Santos GC, Zielenska M, Prasad M, Squire JA (2007). **Chromosome 6p amplification and cancer progression.** *J Clin Pathol.* Jan;60 (1):1-7. PMID 16790693
- Sasaki Y, Niu C, Makino R, Kudo C, Sun C, Watanabe H, Matsunaga J, Takahashi K, Tagami H, Aiba S, Horii A (2004). **BRAF point mutations in primary melanoma show different prevalences by subtype.** *J Invest Dermatol.* Jul;123(1):177-83. PMID: 15191558
- Sauter ER, Yeo UC, von Stemm A, Zhu W, Litwin S, Tichansky DS, Pistritto G, Nesbit M, Pinkel D, Herlyn M, Bastian BC (2002). **Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma.** *Cancer Res.* Jun 1;62(11):3200-6. PMID: 12036934
- Schardt JA, Meyer M, Hartmann CH, Schubert F, Schmidt-Kittler O, Fuhrmann C, Polzer B, Petronio M, Eils R, Klein CA (2005). **Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer.** *Cancer Cell* 8, 227-39. PMID: 16169467
- Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ, Kaufmann M, Diebold J, Arnholdt H, Muller P, Bischoff J, Harich D, Schlimok G, Riethmuller G, Eils R, Klein CA (2003). **From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7737-42. PMID: 12808139
- Sharpless E, Chin L (2003). **The INK4a/ARF locus and melanoma.** *Oncogene.* May 19;22(20):3092-8. PMID: 12789286
- Shinozaki M, Fujimoto A, Morton DL, Hoon DS (2004). **Incidence of BRAF oncogene mutation and clinical relevance for primary cutaneous melanomas.** *Clin Cancer Res.* Mar 1;10(5):1753-7. PMID: 15014028
- Smalley KS (2003). **A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma?** *Int J Cancer.* May 1;104(5):527-32. PMID: 12594806
- Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, McArthur GA, Hutson TE, Moschos SJ, Flaherty KT, Hersey P, Kefford R, Lawrence D, Puzanov I, Lewis KD, Amaravadi RK, Chmielowski B, Lawrence HJ, Shyr Y, Ye F, Li J, Nolop KB, Lee RJ, Joe AK, Ribas A (2012). **Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib.** *N Engl J Med.* 2012 Feb 23;366(8):707-14. PMID: 22356324
- Spatz A, Cook MG, Elder DE, Piepkorn M, Ruiter DJ, Barnhill RL (2003). **Interobserver reproducibility of ulceration assessment in primary cutaneous melanomas.** *Eur J Cancer* Sep;39(13):1861-5. PMID: 12932663
- Stang A, Stang K, Stegmaier C, Hakulinen T, Jöckel KH (2001). **Skin melanoma in Saarland: incidence, survival and mortality 1970–1996.** *Eur J Cancer Prev.* Oct;10(5):407-15. PMID: 11711755
- Stark MS, Woods SL, Gartside MG, Bonazzi VF, Dutton-Regester K, Aoude LG, Chow D, Sereduk C, Niemi NM, Tang N, Ellis JJ, Reid J, Zismann V, Tyagi S, Muzny D, Newsham I, Wu Y, Palmer JM, Pollak T, Youngkin D, Brooks BR, Lanagan C, Schmidt CW, Kobe B, MacKeigan JP, Yin H, Brown KM, Gibbs R, Trent J, Hayward NK (2011). **Frequent somatic mutations in MAP3K5 and MAP3K9 in metastatic melanoma identified by exome sequencing.** *Nat Genet.* Dec 25;44(2):165-9. PMID: 22197930
- Sterry W, P. R. (2000). **Checkliste Dermatologie** (ed. Sterry W, P. R.) 137-139 Thieme, Stuttgart

## 7. Literaturverzeichnis

---

- Stratton MR (2011). **Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise.** *Science*. Mar 25;331(6024):1553-8. PMID: 21436442
- Sumimoto H, Miyagishi M, Miyoshi H, Yamagata S, Shimizu A, Taira K, Kawakami Y (2004). **Inhibition of growth and invasive ability of melanoma by inactivation of mutated BRAF with lentivirus-mediated RNA interference.** *Oncogene*. Aug 12;23(36):6031-9. PMID: 15208655
- Thomas RK, Baker AC, Debiase RM, Winckler W, Laframboise T, Lin WM, Wang M, Feng W, Zander T, MacConaill L, Lee JC, Nicoletti R, Hatton C, Goyette M, Girard L, Majumdar K, Ziaugra L, Wong KK, Gabriel S, Beroukhi R, Peyton M, Barretina J, Dutt A, Emery C, Greulich H, Shah K, Sasaki H, Gazdar A, Minna J, Armstrong SA, Mellinghoff IK, Hodi FS, Dranoff G, Mischel PS, Cloughesy TF, Nelson SF, Liao LM, Mertz K, Rubin MA, Moch H, Loda M, Catalona W, Fletcher J, Signoretti S, Kaye F, Anderson KC, Demetri GD, Dummer R, Wagner S, Herlyn M, Sellers WR, Meyerson M, Garraway LA (2007). **High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer.** *Nat Genet* 39(3): 347-351. PMID: 17293865
- Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF (2005). **Cutaneous melanoma.** *Lancet*. Feb 19-25;365(9460):687-701. PMID: 15721476
- Titus-Ernstoff L, Perry AE, Spencer SK, Gibson JJ, Cole BF, Ernstoff MS (2005). **Pigmentary characteristics and moles in relation to melanoma risk.** *Int. J. Cancer*. PMID: 15761869
- Trust Sanger Institut; Homepage: <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>; Stand Januar 2013
- Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG (2004). **Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma.** *J Invest Dermatol*. Feb;122(2):337-41. PMID: 15009714
- Tsao H, Zhang X, Fowlkes K, Haluska FG (2000). **Relative reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 alterations in cutaneous melanoma cell lines.** *Cancer Res*. Apr 1;60(7):1800-4. PMID: 10766161
- Tucker MA, Goldstein AM (2003). **Melanoma etiology: where are we?** *Oncogene*. May 19;22(20):3042-52. PMID: 12789279
- Ulmer A, Fischer JR, Schanz S, Sotlar K, Breuninger H, Dietz K, Fierlbeck G, Klein CA (2005). **Detection of melanoma cells displaying multiple genomic changes in histopathologically negative sentinel lymph nodes.** *Clin Cancer Res*. Aug 1;11(15):5425-32. PMID: 16061857
- Ulmer A, Dietz K, Hodak I, Polzer B, Scheitler S, Yildiz M, Czyz Z, Lehnert P, Fehm T, Hafner C, Schanz S, Röcken M, Garbe C, Breuninger H, Fierlbeck G, Klein CA (2014). **Quantitative measurement of melanoma spread in sentinel lymph nodes and survival.** *PLoS Med*. 2014 Feb 18;11(2):e1001604. PMID: 24558354
- Uribe P, Wistuba II, González S (2003). **BRAF mutation: a frequent event in benign, atypical, and malignant melanocytic lesions of the skin.** *Am J Dermatopathol*. Oct;25(5):365-70. PMID: 14501284
- Valyi-Nagy I, Rodeck U, Kath R, Mancianti ML, Clark WH, Herlyn M (1991). **The human melanocyte system as a model for studies on tumor progression.** *Basic Life Sci*. 57:315-26; discussion 326-8. PMID: 1814292
- van Dijk M, Sprenger S, Rombout P, Marres H, Kaanders J, Jeuken J, Ruiter D (2003). **Distinct chromosomal aberrations in sinonasal mucosal melanoma as detected by comparative genomic hybridization.** *Genes Chromosomes Cancer*. 2003 Feb;36(2):151-8. PMID: 12508243

## 7. Literaturverzeichnis

---

- van Elsas A, Zerp S, van der Flier S, Krüse-Wolters M, Vacca A, Ruiter DJ, Schrier P (1995). **Analysis of N-ras mutations in human cutaneous melanoma: tumor heterogeneity detected by polymerase chain reaction/single-stranded conformation polymorphism analysis.** *Recent Results Cancer Res.* 139:57-67. PMID: 7597312
- Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB, Garrido MC, Vemula S, Wiesner T, Obenauf AC, Wackernagel W, Green G, Bouvier N, Sozen MM, Baimukanova G, Roy R, Heguy A, Dolgalev I, Khanin R, Busam K, Speicher MR, O'Brien J, Bastian BC (2010). **Mutations in GNA11 in uveal melanoma.** *N Engl J Med.* Dec 2;363(23):2191-9. PMID: 21083380
- Viros A, Fridlyand J, Bauer J, Lasithiotakis K, Garbe C, Pinkel D, Bastian BC (2008). **Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features.** *PLoS Med.* 5(6):e120. PMID: 18532874
- Vízkeleti L, Ecsedi S, Rákossy Z, Orosz A, Lázár V, Emri G, Koroknai V, Kiss T, Ádány R, Balázs M (2012). **The role of CCND1 alterations during the progression of cutaneous malignant melanoma.** *Tumour Biol.* Dec;33(6):2189-99. PMID: 23001925
- Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R; Cancer Genome Project (2004). **Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF.** *Cell.* 116:855-867. PMID: 15035987
- Wei X, Walia V, Lin JC, Teer JK, Prickett TD, Gartner J, Davis S; NISC Comparative Sequencing Program, Stemke-Hale K, Davies MA, Gershenwald JE, Robinson W, Robinson S, Rosenberg SA, Samuels Y (2011). **Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma.** *Nat Genet.* May;43(5):442-6. PMID: 21499247
- Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ (2005). **Breast cancer metastasis: markers and models.** *Nat Rev Cancer.* Aug;5(8):591-602. PMID: 16056258
- Wellbrock C, Ogilvie L, Hedley D, Karasarides M, Martin J, Niculescu-Duvaz D, Springer CJ, Marais R (2004). **V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes.** *Cancer Res.* Apr 1;64(7):2338-42. PMID: 15059882
- Welsh CF, Roovers K, Villanueva J, Liu Y, Schwartz MA, Assoian RK (2001). **Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho.** *Nat Cell Biol.* Nov;3(11):950-7. PMID: 11715015
- Whiteman DC, Pavan WJ, Bastian BC (2011). **The melanomas: a synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin.** *Pigment Cell Melanoma Res.* Oct;24(5):879-97. Epub 2011 Aug 16. PMID:21707960
- Whiteman DC, Whiteman CA, Green AC (2001). **Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies.** *Cancer Causes Control.* Jan;12(1):69-82. PMID: 11227927
- Wong KK (2009). **Recent developments in anti-cancer agents targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway.** *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* Jan;4(1):28-35. PMID: 19149686
- Wu J, Rosenbaum E, Begum S, Westra WH (2007). **Distribution of BRAF T1799A(V600E) mutations across various types of benign nevi: implications for melanocytic tumorigenesis.** *Am J Dermatopathol.* 2007 Dec;29(6):534-7. PMID: 18032947
- Wu X, Northcott PA, Dubuc A, Dupuy AJ, Shih DJ, Witt H, Croul S, Bouffet E, Fults DW, Eberhart CG, Garzia L, Van Meter T, Zagzag D, Jabado N, Schwartzentruber J, Majewski J, Scheetz TE, Pfister SM, Korshunov A, Li XN,

## 7. Literaturverzeichnis

---

- Scherer SW, Cho YJ, Akagi K, MacDonald TJ, Koster J, McCabe MG, Sarver AL, Collins VP, Weiss WA, Largaespada DA, Collier LS, Taylor MD (2012). **Clonal selection drives genetic divergence of metastatic medulloblastoma.** *Nature*. Feb 15;482(7386):529-33. PMID: 22343890
- Yancovitz M, Litterman A, Yoon J, Ng E, Shapiro RL, Berman RS, Pavlick AC, Darvishian F, Christos P, Mazumdar M, Osman I, Polsky D (2012). **Intra- and inter-tumor heterogeneity of BRAF(V600E) mutations in primary and metastatic melanoma.** *PLoS One*. 2012;7(1):e29336. PMID: 22235286
- Yazdi AS, Palmedo G, Flaig MJ, Puchta U, Reckwerth A, Rütten A, Mentzel T, Hügel H, Hantschke M, Schmid-Wendtner MH, Kutzner H, Sander CA (2003). **Mutations of the BRAF gene in benign and malignant melanocytic lesions.** *J Invest Dermatol*. Nov;121(5):1160-2. PMID: 14708620
- ZMM. Zentralregister Malignes Melanom, Tübingen (2002).
- Zorbas H. (1999). **Miniatur-Durchfluß-PCR: ein Durchbruch?** *Angew. Chem*. 111(8):1121-1124.

## 8. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet. Weitere Personen waren an der inhaltlich materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt.

Insbesondere habe ich dafür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....  
(Ort, Datum)

.....  
(Unterschrift)

### Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Ulmer A, Dietz K, **Hodak I**, Polzer B, Scheitler S, Yildiz M, Czyz Z, Lehnert P, Fehm T, Hafner C, Schanz S, Röcken M, Garbe C, Breuninger H, Fierlbeck G, Klein CA (2014). **Quantitative measurement of melanoma spread in sentinel lymph nodes and survival.** *PLoS Med.* Feb 18;11(2):e1001604. PMID: 24558354

## 9. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei den vielen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit sehr unterstützt haben:

**Prof. Dr. Christoph Klein** danke ich für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und die exzellente liebevolle Betreuung dieser Dissertation. Besonders bedanken möchte ich mich bei ihm, dass er mir die Möglichkeit gab als dreifache, berufstätige Mutter diese Arbeit zu Ende zu bringen. Er hat es immer wieder verstanden mich von neuem zu motivieren. Seine wegweisenden und kreativen Ideen haben wesentlich zum Erstellen der Arbeit beigetragen. Ich danke ihm außerdem für seinen Einsatz für die Finanzierung meiner Dissertation und meiner Stelle.

Frau **Dr. Anja Ulmer** danke ich für die gute Zusammenarbeit in unseren beiden Arbeitsgruppen.

Meinem Doktorvater **Prof. Dr. Stefan Schneuwly** für sein Entgegenkommen meine Arbeit als Erstgutachter zu betreuen. Besonders bedanken will ich mich auch für die Freiheit und Geduld, die er mir während der Erstellung gewährte, was maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Ich danke den **Patienten**, die mit ihrer Einwilligung diese Dissertation erst ermöglichten und der **Sander Stiftung** für die Finanzierung des Projektes.

**Dr. Bernhard Polzer** danke ich für die Vermittlung essentieller Kenntnisse für die Anwendung der CGH für einzelne Tumorzellen. Seine Kompetenz in fachlichen und praktischen Fragen war mir stets eine große Hilfe und nicht zuletzt für die persönliche freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ich danke herzlich meinem Mitdoktoranden **Sebastian Scheitler**, der jederzeit geduldig und freundlich war meine Fragen als externe Mitarbeiterin zu beantworten und für die sorgfältige Korrektur meiner Arbeit. Sowie allen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Klein für die außerordentlich gute Zusammenarbeit und für die tolle Zeit während meiner Dissertation.



## 9. Danksagung

---

Besonderer Dank gilt **Manfred Meyer** für die Unterstützung bei der Etablierung und Durchführung der Versuche. Sowie allen anderen TAs der Arbeitsgruppe Klein, die ein Arbeiten im Labor erst möglich machen.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken.

Meinen **Eltern**, die mir ein Studium ermöglichten und mich mein Leben lang unterstützt haben.

Ich danke herzlich meinen drei Mädels **Lea, Mara und Mila**, die viele Abende auf mich verzichten mussten. Und dafür Verständnis zeigten! Hab euch lieb!

Mein größter Dank gilt meinem Mann **Damir**, der immer an mich geglaubt hat. Für seine liebevolle Unterstützung, sein Verständnis und seine Aufmunterungen.

## 10. Anhang

### 10.1 Patientenkollektiv

**Tabelle 33:** *Invasionslevel nach Clark*

Invasionslevel	Eindringtiefe
I	Der Tumor ist rein intraepidermal (Melanoma in situ)
II	Tumorzellen dringen vereinzelt in die papilläre Dermis ein
III	Tumorzellen füllen das Stratum papillare vollständig aus und erreichen das Stadium reticulare
IV	Der Tumor dringt in das Stratum reticulare ein
V	Der Tumor dringt in die Subkutis ein

Maximale Eindringtiefe des Tumors die anhand der anatomischen Strukturen der Haut beschrieben wird (nach Clark et al., 1969).

**Tabelle 34:** *Patientendaten Teil 1 (Geschlecht, Alter, Breslow, TNM, Histologie und Lokalisation)*

Pat ID	m/w	Alter OP bei PT	Breslow (AJCC neu)	Tumorstatus	Histologie	Lokalisation
1	w	68	T2a	pT2NoMo	SSM	Unterschenkel
2	w	53	T2a	pT2aNoMo	SSM	Unterschenkel
3	w	77	T3a	pT3aNoMo	SSM	Brust
4	m	66	T4b	pT4bN1aMo	NM	Rücken
5	m	67	T2a	pT2aNoMo	ALM	Fuß
6	w	47	T2a	pT1NoMo	SSM	Oberschenkel
7	m	68	T3b	pT4NoMo	SSM	Rücken
8	m	71	T4b	pT4bNoMo	SSM	Axilla
9	w	33	T2a	pT3NoMo	Melanozytärer Tumor - mal. Melanom	Rücken
10	w	49	T2a	pT2NoMo	SSM	Oberarm
11	m	74	T2a	pT2NoMo	SSM	Rücken
12	m	69	T2a	pT2a/bNoMo	SSM	Rücken
13	w	70	T4a	pT4aNoMx	ALM	Fuß
14	w	66	T1a	pT1aNoMo	SSM	Unterschenkel
15	w	44	T2b	pT2bNoMo	SSM	Unterschenkel
16	w	86	T2a	pT2aNoMo	SSM	Unterschenkel
17	m	39	T2a	pT3N1Mo	atyp. melanozyt. Naevi - mal. Melanom	Oberschenkel
18	w	36	T2a	pT2aNoMo	Maligne melanozytäre Läsion	Schulter
19	w	67	k.A.	pT4N1Mo	ALM	Fußsohle
20	m	36	T3a	k.A.	atyp. spitznaevus DD - mal. Melanom	Handgelenk
21	w	76	T3a	pT3NoMo	SSM	Oberarm
22	m	59	T2a	pT2NoMo	SSM	Schulter
23	m	43	T2b	pT3N1Mo	SSM	Rücken
24	m	34	T2a	pT3NoMo	SSM	Brust
25	m	64	T3b	pT3N1Mo	NM	Rücken
26	m	66	T3a	pT3N1Mo	SSM	Brust
27	m	46	T2a	pT3NoMo	SSM	Unterarm
28	m	55	T4b	pT4aN1aMo	NM	Rücken

## 10. Anhang

Pat ID	m/w	Alter OP bei PT	Breslow (AJCC neu)	Tumorstatus	Histologie	Lokalisation
29	m	61	T4b	pT4N1Mo	ALM	Fuß
30	m	76	T2b	pT2NoMo	NM	Rücken
31	m	39	T4a	pT4NoMo	NM	Oberschenkel
32	m	75	T4a	pT4NoMo	ALM	Daumen
33	m	62	T4a	pT4NoMo	ALM	Hand
34	m	63	T2a	pT3NoMo	naevoides malignes Melanom	Rücken
35	m	73	T4b	pT4bN1aMo	SSM	Brust
36	w	59	T2a	pT3bNoMo	NM	Oberarm
37	w	59	T2a	pT3bNoMo	NM	Oberarm
38	m	49	T3a	pT3aNoMo	SSM	Oberschenkel
39	m	64	T1a	k.A.	Melanom	Oberarm
40	m	64	T1a	k.A.	Melanom	Oberarm
41	w	23	T2a	pT2aNxMo	SSM	Oberschenkel
42	m	25	T3a	pT3aN1aMo	spitzoides malignes Melanom	Fuß
43	m	36	k.A.	pTxaNxMo	ALM	Hand
44	m	77	T3a	pT3NoMx	NM	Kopf
45	m	64	T3a	pT4NoMo	NM	Rücken
46	m	79	T2a	pT2aNoMo	SSM	Unterarm
47	w	42	T3a	pT3NoMo	SSM	Gesicht
48	m	69	T2a	pT1bNoMo	NM	Bauch
49	m	69	T2a	pT1bNoMo	NM	Bauch
50	m	76	T3b	pT3aNoMo	NM	Rücken
51	m	45	T3b	pT3NoMo	SSM	Brust
52	w	38	T3a	pT3NoMo	NM	Unterschenkel

In dieser Tabelle sind die wichtigsten Patientendaten (Untergruppen) aufgelistet. (Pat ID = Patientenummerierung dieser Arbeit; m=Mann; w=Frau; k.A.=keine Angaben)

**Tabelle 35: Patientendaten Teil 2 (Clark Level, Curtin, Regression, Ulzeration und Pathologie)**

Pat ID	Clark Level	Curtin* Klassifizierung	Regression	Ulzeration	Befund Pathologie
1	IV	Non-CSD	0	0	neg
2	III	Non-CSD	0	0	neg
3	IV	Non-CSD	0	0	neg
4	V	Non-CSD	0	1	pos
5	III	AM	0	0	neg
6	IV	Non-CSD	0	0	neg
7	IV	Non-CSD	0	1	neg
8	V	Non-CSD	0	1	neg
9	IV	Non-CSD	0	0	neg
10	III	Non-CSD	0	0	neg
11	III	Non-CSD	0	0	pos
12	IV	Non-CSD	0	0	neg
13	V	AM	0	0	neg
14	III	Non-CSD	1	0	neg
15	III	Non-CSD	0	1	neg
16	III	Non-CSD	0	0	neg

## 10. Anhang

Pat ID	Clark Level	Curtin* Klassifizierung	Regression	Ulzeration	Befund Pathologie
17	IV	Non-CSD	0	0	neg
18	III	Non-CSD	0	0	neg
19	k.A.	AM	0	0	pos
20	IV	Non-CSD	0	0	neg
21	IV	Non-CSD	0	0	neg
22	IV	Non-CSD	0	0	neg
23	IV	Non-CSD	1	1	pos
24	IV	Non-CSD	0	0	neg
25	IV	Non-CSD	0	1	pos
26	IV	Non-CSD	0	0	pos
27	III	Non-CSD	0	0	neg
28	V	Non-CSD	0	1	pos
29	V	AM	1	1	pos
30	III	Non-CSD	0	1	neg
31	V	Non-CSD	0	0	neg
32	V	AM	0	0	neg
33	V	AM	0	0	neg
34	III	Non-CSD	0	0	neg
35	IV	Non-CSD	0	1	neg
36	IV	Non-CSD	0	0	neg
37	IV	Non-CSD	0	0	neg
38	IV	Non-CSD	0	0	neg
39	III	Non-CSD	0	0	neg
40	III	Non-CSD	0	0	neg
41	III	Non-CSD	0	0	neg
42	IV	Non-CSD	0	0	neg
43	k.A.	AM	0	0	neg
44	IV	CSD	0	0	neg
45	IV	Non-CSD	0	0	neg
46	III	Non-CSD	0	0	neg
47	IV	CSD	0	0	neg
48	III	Non-CSD	1	0	neg
49	III	Non-CSD	1	0	neg
50	IV	Non-CSD	0	1	neg
51	IV	Non-CSD	0	1	pos
52	IV	Non-CSD	0	0	neg

*In dieser Tabelle sind die wichtigsten Patientendaten (Untergruppen) aufgelistet. (0=nein; 1=ja/vorhanden; neg=negativ, pos=positiv; k.A.=keine Angaben)*

## 10.2 Ausführliche ErgebnissTabellen

**Tabelle 36:** Anzahl der isolierten Einzelzellen und Areale

Pat ID	Anzahl Areale PT	Anzahl DTC	Anzahl Areale Met
1	1	1	
2	2	1	
3	1	6	
4	3	5	6
5	1	1	
6	1	3	
7	1	3	
8	1	3	
9	3	3	
10	1	1	
11	1	3	4
12	1	3	
13	1	4	
14	1	3	
15	1	5	
16	2	1	
17	1	1	
18	2	-	
19	3	-	
20	2	-	
21	2	-	
22	1	-	
23	3	1	
24	4	2	3
25	2	4	
26	2	-	
27	2	2	
28	2	3	
29	2	2	2
30	4	4	
31	3	2	
32	2	2	
33	2	2	
34	2	-	
35	1	7	
36	-	-	
37	-	2	
38	-	5	
39	-	3	
40	-	4	
41	-	3	
42	-	7	
43	-	4	2
44	-	1	12
45	-	3	

## 10. Anhang

Pat ID	Anzahl Areale PT	Anzahl DTC	Anzahl Areale Met
46	-	7	
47	-	-	
48	-	2	
49	-	-	
50	-	2	
51		1	4
52	-	1	
Summe:	64	123	33

**Tabelle 37:** Liste der Zellzahlen der SLN bei den einzelnen Färbungen

Pat ID	Zz/Mio	Melan A	HMB45	HMB45	Melan A	S100
1	1,92	0/1 Mio	14/1 Mio	neg	neg	neg
2	6,08	0/1 Mio	3/2 Mio	neg	neg	neg
3	6,08	11/1 Mio	98/2 Mio	neg	neg	neg
4	12,16	67/1 Mio	190/2 Mio	pos	pos	pos
5	32,00	0/1 Mio	5/2 Mio	neg	neg	neg
6	3,44	0/1 Mio	2/2 Mio	k.A	k.A	k.A
7	13,76	1/1 Mio	153/2 Mio	neg	neg	neg
8	22,08	5/1 Mio	80/2 Mio	n.d	n.d	n.d
9	46,08	0/1 Mio	27/2 Mio	neg	neg	neg
10	6,08	0/1 Mio	2/2 Mio	neg	neg	neg
11	12,80	261/1 Mio	248/2 Mio	n.d	pos	n.d
12	7,68	4/1 Mio	5/2 Mio	neg	neg	neg
13	20,48	11/1 Mio	16/2 Mio	neg	neg	neg
14	9,28	0/1 Mio	1/2 Mio	neg	neg	neg
15	2,88	5/1 Mio	37/2 Mio	neg	neg	neg
16	12,92	15/1 Mio	4/2 Mio	pos	pos	pos
17	2,88	0/1 Mio	130/2 Mio	neg	neg	neg
18	3,4	4/1 Mio	6/2 Mio	neg	n.d	neg
19	21,6	2/3 Mio	7/3 Mio	pos	n.d	pos
20	1,1	0/1 Mio	229/1 Mio	neg	n.d	neg
21	6,96	13/3 Mio	8/4 Mio	neg	n.d	neg
22	5,92	18/3 Mio	28/3 Mio	neg	n.d	neg
23	7,44	20/1 Mio	3/6 Mio	n.d.	pos	pos
24	4,56	2/1 Mio	8/1 Mio	pos	pos	pos
25	10,88	800000/1 Mio	800000/1 Mio	n.d	pos	pos
26	9,2	986/2 Mio	2199/2 Mio	pos	n.d	pos
27	50,56	0/1 Mio	38/1 Mio	neg	neg	neg
28	17,56	68.000/1 Mio	57500/1 Mio	pos	pos	pos
29	58,56	852/1Mio	412/1 Mio	pos	pos	pos
30	6,08	0/1 Mio	11/2 Mio	neg	neg	neg
31	14,76	5/1 Mio	20/2 Mio	neg	neg	neg
32	9,16	0/1 Mio	21/2 Mio	neg	neg	neg
33	15,04	0/1 Mio	19/2 Mio	neg	neg	neg
34	4,16	0/1 Mio	14 / 2 Mio	neg	n.d	neg
35	0,48	n.d.	0/0,15 Mio	-	-	-
36	3,04	1/1 Mio	4/2 Mio	neg	neg	neg
37	15,68	8/1 Mio	7/2 Mio	neg	neg	neg
38	17,92	18/Mio	161/2Mio	neg	neg	neg
39	3,28	1795/1 Mio	388/2 Mio	neg	neg	pos
40	2,16	1221/1 Mio	227/1 Mio	neg	neg	pos
41	12,48	0/1 Mio	8/2 Mio	neg	neg	neg
42	13,77	311/1 Mio	48/2 Mio	neg	neg	neg
43	12,48	349/1 Mio	3/2 Mio	n.d	neg	n.d
44	2,08	3/1 Mio	0/1 Mio	neg	neg	neg

## 10. Anhang

Pat ID	Zz/Mio	Melan A	HMB45	HMB45	Melan A	S100
45	10,24	79/1 Mio	30/2 Mio	neg	neg	neg
46	4,48	0/1 Mio	215/2 Mio	neg	neg	neg
47	9,92	0/1 Mio	13/1 Mio	pos	pos	pos
48	8,96	21/1 Mio	72/1 Mio	n.d	neg	n.d
49	2,56	8/1 Mio	30/1 Mio	n.d.	neg	n.d
50	2,48	24/1 Mio	32/1 Mio	n.d	neg	neg
51	34,88	1580/1 Mio	824/2 Mio	pos	pos	pos
52	18,24	0/1 Mio	5/2 Mio	neg	neg	neg

**Tabelle 38: Komplettes prozentuales Vorkommen von aberranten Chromosomenregionen in den Tumortypen**

Chromosomenregion	PT (n=28)		DTC (n=44)		Met (n=9)		DTC pN0 (n=32)		DTC pN1 (n=12)	
	Del (%)	Amp (%)	Del (%)	Amp (%)	Del (%)	Amp (%)	Del (%)	Amp (%)	Del (%)	Amp (%)
1p32pter	35,7	3,6	4,5	27,3	44,4	0,0	3,1	37,5	8,3	0,0
1pcenp31	7,1	21,4	0,0	15,9	0,0	0,0	0,0	21,9	0,0	0,0
1q	3,6	28,6	2,3	18,2	0,0	22,2	0,0	21,9	8,3	8,3
2p	0,0	10,7	4,5	9,1	0,0	22,2	0,0	12,5	16,7	0,0
2q	0,0	28,6	4,5	4,5	0,0	33,3	3,1	6,3	8,3	0,0
3p	3,6	25,0	0,0	0,0	33,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3q	3,6	25,0	0,0	22,7	11,1	22,2	0,0	25,0	0,0	16,7
4p	3,6	46,4	2,3	2,3	0,0	0,0	3,1	0,0	0,0	8,3
4q	10,7	53,6	6,8	4,5	0,0	0,0	9,4	0,0	0,0	16,7
5p	0,0	21,4	6,8	11,4	44,4	0,0	3,1	15,6	16,7	0,0
5q	3,6	35,7	6,8	13,6	44,4	0,0	3,1	18,8	16,7	0,0
6p	0,0	46,4	2,3	38,6	0,0	22,2	3,1	43,8	0,0	25,0
6q	14,3	28,6	25,0	0,0	11,1	22,2	21,9	0,0	33,3	0,0
7p	3,6	39,3	4,5	11,4	11,1	33,3	6,3	15,6	0,0	0,0
7qcenq21	10,7	25,0	4,5	18,2	33,3	0,0	6,3	25,0	0,0	0,0
7q22q32	3,6	53,6	4,5	18,2	0,0	22,2	6,3	25,0	0,0	0,0
7q33qter	3,6	32,1	4,5	18,2	11,1	0,0	6,3	25,0	0,0	0,0
8p	0,0	3,6	2,3	11,4	0,0	11,1	3,1	15,6	0,0	0,0
8qcenq23	3,6	35,7	2,3	13,6	0,0	22,2	3,1	18,8	0,0	0,0
8q24.1qter	3,6	10,7	0,0	9,1	0,0	22,2	0,0	12,5	0,0	0,0
9p	39,3	10,7	20,5	4,5	55,6	0,0	15,6	6,3	33,3	0,0
9qcenq22	46,4	7,1	18,2	2,3	77,8	0,0	9,4	3,1	41,7	0,0
9q31qter	28,6	7,1	13,6	6,8	22,2	0,0	9,4	9,4	25,0	0,0
10p	21,4	7,1	0,0	13,6	33,3	0,0	0,0	15,6	0,0	8,3
10q	21,4	3,6	0,0	15,9	33,3	0,0	0,0	18,8	0,0	8,3
11p	10,7	10,7	0,0	15,9	0,0	33,3	0,0	12,5	0,0	25,0
11qcenq13	14,3	7,1	0,0	38,6	11,1	0,0	0,0	40,6	0,0	33,3
11q14q22	10,7	14,3	13,6	9,1	0,0	22,2	15,6	6,3	8,3	16,7
11q23qter	25,0	0,0	13,6	4,5	0,0	22,2	15,6	3,1	8,3	8,3
12p	0,0	28,6	2,3	11,4	0,0	22,2	3,1	15,6	0,0	0,0
12qcenq22	0,0	25,0	4,5	11,4	0,0	11,1	6,3	15,6	0,0	0,0

## 10. Anhang

Chromosomenregion	PT (n=28)		DTC (n=44)		Met (n=9)		DTC pN0 (n=32)		DTC pN1 (n=12)	
	Del (%)	Amp (%)	Del (%)	Amp (%)	Del (%)	Amp (%)	Del (%)	Amp (%)	Del (%)	Amp (%)
12q23qter	32,1	3,6	2,3	11,4	22,2	0,0	3,1	15,6	0,0	0,0
13q	3,6	32,1	9,1	6,8	0,0	33,3	12,5	9,4	0,0	0,0
14qcenq21	3,6	28,6	0,0	4,5	0,0	0,0	0,0	6,3	0,0	0,0
14q22qter	3,6	17,9	0,0	11,4	0,0	22,2	0,0	15,6	0,0	0,0
15qcenq21	3,6	7,1	4,5	4,5	0,0	11,1	6,3	6,3	0,0	0,0
15q22qter	0,0	10,7	0,0	29,5	0,0	22,2	0,0	31,3	0,0	25,0
16p	46,4	7,1	2,3	15,9	33,3	0,0	3,1	18,8	0,0	8,3
16q	35,7	7,1	2,3	11,4	33,3	0,0	3,1	15,6	0,0	0,0
17p	46,4	3,6	2,3	36,4	44,4	11,1	3,1	40,6	0,0	25,0
17q	39,3	7,1	0,0	36,4	44,4	22,2	0,0	37,5	0,0	33,3
18p	3,6	7,1	2,3	6,8	0,0	0,0	3,1	9,4	0,0	0,0
18q	3,6	17,9	9,1	4,5	22,2	0,0	12,5	6,3	0,0	0,0
19p	67,9	3,6	11,4	22,7	55,6	11,1	9,4	25,0	16,7	16,7
19q	67,9	7,1	18,2	18,2	55,6	11,1	18,8	18,8	16,7	16,7
20p	7,1	14,3	0,0	22,7	0,0	22,2	0,0	31,3	0,0	0,0
20q	32,1	7,1	0,0	45,5	44,4	11,1	0,0	53,1	0,0	25,0
21q	0,0	25,0	2,3	25,0	0,0	22,2	3,1	28,1	0,0	16,7
22q	53,6	10,7	2,3	36,4	33,3	22,2	3,1	37,5	0,0	33,3
Xp	7,1	21,4	6,8	15,9	0,0	22,2	9,4	15,6	0,0	16,7
Xqcenq13	7,1	17,9	9,1	20,5	0,0	22,2	12,5	18,8	0,0	25,0
Xq21qter	7,1	28,6	6,8	13,6	0,0	22,2	9,4	12,5	0,0	16,7
Y	17,9	0,0	6,8	4,5	11,1	0,0	6,3	0,0	8,3	2

**Tabelle 39: Aberrationenanzahl der CGH-Profile pro Probe**

	01 DTC 01	01 PT 01	02 PT 01	02 DTC 01	03 PT 01	03 DTC 05	04 DTC 01	04 DTC 02	04 DTC 03	04 DTC 04	04 DTC 06	04 Met 02	04 Met 03	05 DTC 01
1)	2	0	10	4	4	0	5	1	9	2	1	14	4	1
2)	7	4	4	1	1	20	7	1	4	4	0	4	0	10
3)	9	4	14	5	5	20	12	2	13	6	1	18	4	11

	05 PT 01	06 DTC 01	06 PT 01	07 DTC 02	07 PT 01	08 DTC 01	08 DTC 03	08 PT 01	09 DTC 01	09 DTC 02	09 DTC 03	09 PT 02	09 PT 03	10 DTC 01
1)	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1	0	1	7	0
2)	10	9	6	13	3	7	9	2	8	2	3	3	10	5
3)	11	10	7	15	4	8	10	3	10	3	3	4	17	5

	10 PT 01	11 PT 01	11 DTC 01	11 DTC 02	11 Met 01	11 Met 02	12 DTC 02	12 DTC 03	12 PT 01	13 DTC 02	13 PT 01	14 DTC 02	14 PT 01	15 DTC 01
1)	1	6	3	0	0	0	4	5	5	0	1	7	1	2
2)	0	1	7	7	1	2	9	5	7	4	21	13	0	15
3)	1	7	10	7	1	2	13	10	12	4	22	20	1	17

	15 PT 01	16 PT 01	16 PT 02	17 PT 01	24 DTC 01	24 PT 02	24 Met 01	24 Met 02	25 DTC 03	26 PT 02	27 DTC 02	27 PT 02	28 PT 01	28 PT 02
1)	9	5	2	10	2	12	10	9	0	0	4	9	10	9
2)	3	10	2	7	8	5	1	0	3	2	0	17	20	22
3)	12	15	4	17	10	17	11	9	3	2	4	26	30	31



## 10. Anhang

	28 DTC 01	29 DTC 03	29 PT 01	29 Met 01	30 PT 02	30 PT 03	30 PT 04	30 DTC 03	31 DTC 01	35 PT 01	37 DTC 01	42 DTC 04	43 DTC 01	44 DTC 01
1)	0	0	1	3	12	12	14	5	1	0	0	0	0	4
2)	1	2	14	5	15	13	2	5	2	4	1	6	8	16
3)	1	2	15	8	27	25	16	10	3	4	1	6	8	20

	46 DTC 03	50 DTC 02	51 Met 01	51 Met 02
1)	5	3	9	7
2)	14	11	19	19
3)	19	14	28	26

1) Anzahl Deletionen; 2) Anzahl Amplifikationen-, 3) Anzahl Aberrationen-, n=74 aberrante Profile; schwarz DTC; Blau PT und lila Met.

**Tabelle 40: SSCP Ergebnisse der Onkogene B-RAF und N-RAS in allen Proben**

Pat ID	PT-ID	PT-B-RAF	PT-N-RAS61	DTC-ID	DTC-B-RAF	DTC-N-RAS61	Met-ID	Met-B-RAF	Met-N-RAS61
1	01 PT 01	wt	wt	01 DTC 01	wt	wt (st)			
2	02 PT 01	wt	wt	02 DTC 01	wt	wt (st)			
	02 PT 02	wt	wt						
3	03 PT 01	wt	N-RAS (p.Q61R*)	03 DTC 01	wt	wt			
				03 DTC 02	wt	wt			
				03 DTC 03	wt	wt			
				03 DTC 04	wt	N-RAS (p.Q61K)			
				03 DTC 05	wt	wt (st)			
				03 DTC 06	wt	wt			
4	04 PT 01	wt	NA	04 DTC 01	B-RAF het	wt	04 Met 01	wt	wt
	04 PT 02	wt	NA	04 DTC 02	wt	wt	04 Met 02	B-RAF het	wt
	04 PT 03	wt	NA	04 DTC 03	B-RAF het	wt	04 Met 03	B-RAF het	wt
				04 DTC 04	wt	wt	04 Met 04	wt	wt
				04 DTC 06	wt	wt	04 Met 05	wt	wt
							04 Met 06	wt	wt
5	05 PT 01	wt	NA	05 DTC 01	wt	wt (st)			
6	06 PT 01	wt	N-RAS (p.Q61K)	06 DTC 01	wt	wt			
				06 DTC 02	wt	wt			
				06 DTC 03	wt	wt			
7	07 PT 01	wt	wt	07 DTC 01	wt	wt			
				07 DTC 02	wt	wt			
				07 DTC 03	wt	wt			
8	08 PT 01	wt	wt	08 DTC 01	wt	wt			
				08 DTC 02	wt	wt			
				08 DTC 03	wt	wt			
9	09 PT 01	wt	wt (st)	09 DTC 01	wt	wt (st)			
	09 PT 02	wt	NA	09 DTC 02	wt	wt			
	09 PT 03	B-RAF het	wt	09 DTC 03	wt	wt (st)			
10	10 PT 01	wt	wt (st)	10 DTC 01	wt	wt			
11	11 PT 01	B-RAF het	N-RAS (p.Q61R)	11 DTC 01	wt	wt (st)	11 Met 01	B-RAF het	wt
				11 DTC 02	wt	wt (st)	11 Met 02	wt	NA
				11 DTC 03	wt	wt (st)	11 Met 03	wt	NA

## 10. Anhang

Pat ID	PT-ID	PT-B-RAF	PT-N-RAS61	DTC-ID	DTC-B-RAF	DTC-N-RAS61	Met-ID	Met-B-RAF	Met-N-RAS61
							11 Met 04	wt	wt
12	12 PT 01	wt (st)	wt	12 DTC 01	wt	wt			
				12 DTC 02	wt	wt			
				12 DTC 03	wt	wt			
13	13 PT 01	B-RAF het	wt	13 DTC 01	wt	wt			
				13 DTC 02	wt	wt			
				13 DTC 03	wt	N-RAS (p.Q61K)			
				13 DTC 04	wt	wt (st)			
14	14 PT 01	wt	wt	14 DTC 01	wt	wt			
				14 DTC 02	wt	wt (st)			
				14 DTC 03	wt	wt			
15	15 PT 01	B-RAF het	wt (st)	15 DTC 01	wt	wt (st)			
				15 DTC 02	wt	wt			
				15 DTC 03	wt	wt			
				15 DTC 04	wt	wt			
				15 DTC 05	wt	wt			
16	16 PT 01	wt	N-RAS (p.Q61R*)	16 DTC 01	wt	wt			
	16 PT 02	wt	wt						
17	17 PT 01	B-RAF het	wt	17 DTC 01	wt	wt			
18	18 PT 01	wt	NA						
	18 PT 02	wt	NA						
19	19 PT 01	wt	wt (st)						
	19 PT 02	wt	wt						
	19 PT 03	wt	wt (st)						
20	20 PT 01	B-RAF het	wt						
	20 PT 02	wt	wt						
21	21 PT 01	wt	NA						
	21 PT 02	wt	wt						
22	22 PT 01	wt	NA						
23	23 PT 01	wt	wt	23 DTC 01	wt	NA			
	23 PT 02	wt	NA						
	23 PT 03	B-RAF homo	wt						
24	24 PT 01	B-RAF het	wt	24 DTC 01	wt	wt	24 Met 01	wt	wt
	24 PT 02	B-RAF het	wt	24 DTC 02	wt	wt	24 Met 02	wt	wt
	24 PT 03	wt	wt				24 Met 03	B-RAF homo	wt
	24 PT 04	B-RAF homo	wt						
25	25 PT 01	B-RAF het	wt	25 DTC 01	wt	wt			
	25 PT 02	B-RAF het	wt	25 DTC 02	wt	wt			
				25 DTC 03	wt	wt			
				25 DTC 04	wt	wt			
26	26 PT 01	wt	wt						
	26 PT 02	NA	wt						
27	27 PT 01	wt (st)	wt	27 DTC 01	wt	wt (st)			
	27 PT 02	wt	wt	27 DTC 02	wt	wt			
28	28 PT 01	B-RAF (p.V600E*)	wt	28 DTC 01	wt	wt			
	28 PT 02	B-RAF het	wt	28 DTC 02	wt	wt			
				28 DTC 03	B-RAF (p.V600E*)	wt			
29	29 PT 01	B-RAF het	wt	29 DTC 01	wt	N-RAS (p.Q61R*)	29 Met 01	B-RAF het	wt
	29 PT 02	B-RAF het	wt	29 DTC 02			29 Met 02	wt	wt

## 10. Anhang

Pat ID	PT-ID	PT-B-RAF	PT-N-RAS61	DTC-ID	DTC-B-RAF	DTC-N-RAS61	Met-ID	Met-B-RAF	Met-N-RAS61
				29 DTC 03	wt	wt			
30	30 PT 01	B-RAF het	wt	30 DTC 01	wt	wt			
	30 PT 02	B-RAF het	wt	30 DTC 02	wt	wt			
	30 PT 03	wt	wt	30 DTC 03	wt	wt (st)			
	30 PT 04	wt	wt	30 DTC 04	wt	NA			
31	31 PT 01	wt	NA	31 DTC 01	wt	wt			
	31 PT 02	NA	NA	31 DTC 02	wt	wt			
	31 PT 03	NA	NA						
32	32 PT 01	wt	wt	32 DTC 01	wt	NA			
	32 PT 02	wt	wt	32 DTC 02	wt	wt			
33	33 PT 01	wt	wt	33 DTC 01	wt	wt			
	33 PT 02	wt	wt	33 DTC 02	wt	NA			
34	34 PT 01	wt	wt						
	34 PT 02	wt	wt						
35	35 PT 01	B-RAF (p.V600K)	wt	35 DTC 01	wt	wt			
				35 DTC 02	wt	wt			
				35 DTC 03	wt	wt			
				35 DTC 04	B-RAF het	wt			
				35 DTC 05	wt	wt			
				35 DTC 06	wt	wt			
				35 DTC 07	wt	wt			
37				37 DTC 01	wt	wt			
				37 DTC 02	wt	wt			
38				38 DTC 01	wt	N-RAS (p.Q61R)			
				38 DTC 02	wt	wt			
				38 DTC 03	wt	wt			
				38 DTC 04	wt	wt			
				38 DTC 05	wt	N-RAS (p.Q61R)			
40				40 DTC 01	wt	wt			
				40 DTC 02	wt	wt			
				40 DTC 03	wt	wt			
				40 DTC 04	wt	N-RAS (p.Q61R*)			
				40 DTC 05	wt	wt			
				40 DTC 06	wt	NA			
				40 DTC 07	wt	wt (st)			
41				41 DTC 01	wt	wt			
				41 DTC 02	wt	wt			
				41 DTC 03	wt	wt (st)			
42				42 DTC 01	wt	wt			
				42 DTC 02	wt	wt			
				42 DTC 03	wt	wt			
				42 DTC 04	wt	wt			
				42 DTC 05	wt	wt			
				42 DTC 06	wt	wt			
				42 DTC 07	wt	wt			
43				43 DTC 01	wt	wt	43 Met 01	wt	NA
				43 DTC 02	wt	wt (st)	43 Met 02	wt	wt
				43 DTC 03	wt	wt (st)			
				43 DTC 04	wt	wt (st)			
44				44 DTC 01	wt	N-RAS (p.Q61K)	44 Met 01	wt	wt
							44 Met 02	wt	wt
							44 Met 03	wt	wt

## 10. Anhang

Pat ID	PT-ID	PT-B-RAF	PT-N-RAS61	DTC-ID	DTC-B-RAF	DTC-N-RAS61	Met-ID	Met-B-RAF	Met-N-RAS61
							44 Met 04	wt	wt
							44 Met 05	wt	wt
							44 Met 06	wt	wt
							44 Met 07	wt	wt
							44 Met 08	wt	wt
							44 Met 09	wt	wt
							44 Met 10	wt	wt
							44 Met 11	wt	wt
							44 Met 12	wt	wt
45				45 DTC 01	wt	wt			
				45 DTC 02	wt	N-RAS (p.Q61K)			
				45 DTC 03	B-RAF het	wt			
46				46 DTC 01	wt	wt (st)			
				46 DTC 02	wt	wt (st)			
				46 DTC 03	NA	NA			
				46 DTC 04	wt	wt (st)			
				46 DTC 05	wt	N-RAS (p.Q61K)			
				46 DTC 06	wt	wt			
				46 DTC 07	wt	wt			
48				48 DTC 01	wt	wt (st)			
				48 DTC 02	wt	wt			
50				50 DTC 01	wt	wt (st)			
				50 DTC 02	wt	N-RAS (p.Q61K)			
51				51 DTC 01	wt	wt	51 Met 01	B-RAF het	wt
							51 Met 02	B-RAF het	wt
							51 Met 03	wt	wt
							51 Met 04	wt	wt
52				52 DTC 01	wt	wt			

het=heterozygote Mutation; homo=homozygote Mutation; NA = nicht auswertbar/keine PCR möglich

**Tabelle 41: Kombinationen zwischen PT und DTC der PT/DTC-Paare.**

Mutationsvorkommen	Patienten in %	Anzahl
PT <sub>wt</sub> - DTC <sub>wt</sub>	42,9	12
PT <sub>B_mt1</sub> - DTC <sub>wt</sub>	25,0	7
PT <sub>B_mt1</sub> - DTC <sub>N_mt1/mt2</sub>	7,1	2
PT <sub>wt</sub> - DTC <sub>B_mt1</sub>	3,6	1
PT <sub>N_mt1/mt2</sub> - DTC <sub>wt</sub>	7,1	2
PT <sub>N_mt1</sub> - DTC <sub>N_mt2</sub>	3,6	1
PT <sub>B_mt1/mt2</sub> - DTC <sub>B_mt1</sub>	7,1	2
PT <sub>B_mt1+N_mt1</sub> - DTC <sub>wt</sub>	3,6	1
Summe		28

B\_mt1=B-RAF p.V600E; B\_mt2=B-RAF p.V600K; N\_mt1=N-RAS p.Q61R; N\_mt2=N-RAS p.Q61; mt1/mt2=Mutation 1 oder 2; mt1+mt2=Mutation 1 und 2; wt=wildtyp; n=28 Patienten.

**Tabelle 42: Cyclin D1 Ergebnisse der qPCR**

Pat ID	N-Status	CGH 11q13	CCND1-Primer			Referenzgene						alle NZ	CCND1
			C	D	F	R1	R2	R3	R4	R5	R6		
01 DTC 01	pN0	amp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,982986233	pos
02 DTC 01	pN0	neg	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0,727200347	neg
03 DTC 01	pN0	n.d	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	
03 DTC 02	pN0	NP	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,783974526	neg
03 DTC 03	pN0	n.d	1	0	1	1	0	0	0	0	0	NA	NA
03 DTC 04	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,944463631	neg
03 DTC 05	pN0	amp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,964583313	pos
03 DTC 06	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,788058114	neg
04 DTC 01	pN1	amp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,952180007	pos
04 DTC 02	pN1	neg	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,852260819	neg
04 DTC 03	pN1	amp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,651640643	neg
04 DTC 04	pN1	neg	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,546983434	neg
04 DTC 06	pN1	neg	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0,632014534	neg
05 DTC 01	pN0	neg	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,991571793	pos
06 DTC 01	pN0	amp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,837920778	neg
06 DTC 02	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,637592644	neg
06 DTC 03	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,762488182	neg
07 DTC 01	pN0	NP	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,662434172	neg
07 DTC 02	pN0	amp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,509921491	neg
07 DTC 03	pN0	NP	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,593936821	neg
08 DTC 01	pN0	neg	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,348885956	neg

## 10. Anhang

Pat ID	N-Status	CGH 11q13	CCND1-Primer			Referenzgene						alle NZ	CCND1
			C	D	F	R1	R2	R3	R4	R5	R6		
08 DTC 02	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,115202038	neg
08 DTC 03	pN0	neg	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,362336637	neg
09 DTC 01	pN0	neg	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,956453097	pos
09 DTC 02	pN0	neg	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,649369568	neg
09 DTC 03	pN0	amp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,704449187	neg
10 DTC 01	pN0	neg	1	1	1	1	0	1	0	1	1	NA	NA
11 DTC 01	pN1	amp	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	
11 DTC 02	pN1	amp	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	
11 DTC 03	pN1	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,803233763	neg
12 DTC 01	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,897484431	neg
12 DTC 02	pN0	amp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,875869344	neg
12 DTC 03	pN0	neg	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0,907457187	neg
13 DTC 01	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,755553154	neg
13 DTC 02	pN0	neg	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,412995151	neg
13 DTC 03	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,368725313	neg
13 DTC 04	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,928803612	neg
14 DTC 01	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,369815153	neg
14 DTC 02	pN0	amp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,814947052	neg
14 DTC 03	pN0	NP	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,610388878	neg
15 DTC 01	pN0	amp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,839651764	neg
15 DTC 02	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,610364338	neg
15 DTC 03	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,927652735	neg
15 DTC 04	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,886305048	neg
15 DTC 05	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,907575774	neg
16 DTC 01	pN0	neg	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,774818111	neg
17 DTC 01	pN0	n.d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA
23 DTC 01	pN1	n.d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA
24 DTC 01	pN0	amp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
24 DTC 02	pN0	n.d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
25 DTC 01	pN1	NP	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,151482939	neg
25 DTC 02	pN1	n.d	0	0	0	1	0	1	0	0	0	NA	NA
25 DTC 03	pN1	neg	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,344894249	neg
25 DTC 04	pN1	n.d	0	0	0	0	1	0	0	0	1	NA	NA
27 DTC 01	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,827694131	neg
27 DTC 02	pN0	neg	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,774552627	neg
28 DTC 01	pN1	neg	1	0	1	0	1	0	1	0	1	NA	NA
28 DTC 02	pN1	n.d	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0,686578313	neg
28 DTC 03	pN1	n.d	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0,666815714	neg
29 DTC 01	pN1	NP	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,703009541	neg
29 DTC 02	pN1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
29 DTC 03	pN1	neg	1	1	1	0	0	0	0	0	0	NA	NA

## 10. Anhang

Pat ID	N-Status	CGH 11q13	CCND1-Primer			Referenzgene						alle NZ	CCND1
			C	D	F	R1	R2	R3	R4	R5	R6		
30 DTC 01	pN0	n.d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA
30 DTC 02	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,648568624	neg
30 DTC 03	pN0	amp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,942003167	neg
30 DTC 04	pN0	n.d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA
31 DTC 01	pN0	neg	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,542839179	neg
31 DTC 02	pN0	n.d	1	1	1	1	1	0	0	0	1	NA	NA
32 DTC 01	pN0	n.d	1	1	1	0	0	1	0	1	1	NA	NA
32 DTC 02	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,342060917	neg
33 DTC 01	pN0	n.d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA
33 DTC 02	pN0	n.d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA
35 DTC 01	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,578369249	neg
35 DTC 02	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,81785797	neg
35 DTC 03	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,801085363	neg
35 DTC 04	pN0	n.d	0	0	1	0	0	1	1	1	0	NA	NA
35 DTC 05	pN0	n.d	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0,973769705	pos
35 DTC 06	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,552863658	neg
35 DTC 07	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,573577206	neg
37 DTC 01	pN0	neg	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,734597032	neg
37 DTC 02	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,845745832	neg
38 DTC 01	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,534834282	neg
38 DTC 02	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,453227732	neg
38 DTC 03	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,405236557	neg
38 DTC 04	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,501477193	neg
38 DTC 05	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,473850949	neg
40 DTC 01	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,279239763	neg
40 DTC 02	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,323584117	neg
40 DTC 03	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,406988528	neg
40 DTC 04	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,491565943	neg
40 DTC 05	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,564053411	neg
40 DTC 06	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,297489842	neg
40 DTC 07	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,93172733	neg
41 DTC 01	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,801853328	neg
41 DTC 02	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,868817128	neg
41 DTC 03	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,936296092	neg
42 DTC 01	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,729681123	neg
42 DTC 02	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0,424469912	neg
42 DTC 03	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,743186526	neg
42 DTC 04	pN0	neg	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,775289795	neg
42 DTC 05	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,735181201	neg
42 DTC 06	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,646116487	neg
42 DTC 07	pN0	n.d	0	1	0	1	1	1	1	1	1	NA	NA

Pat ID	N-Status	CGH 11q13	CCND1-Primer			Referenzgene						alle NZ	CCND1
			C	D	F	R1	R2	R3	R4	R5	R6		
43 DTC 01	pN0	neg	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,764996646	neg
43 DTC 02	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,93082768	neg
43 DTC 03	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,930780852	neg
43 DTC 04	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,966045124	pos
44 DTC 01	pN0	amp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,775911764	neg
45 DTC 01	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,815368512	neg
45 DTC 02	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,921892331	neg
45 DTC 03	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,797413267	neg
46 DTC 01	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,991543256	pos
46 DTC 02	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,962500011	pos
46 DTC 03	pN0	amp	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0,962838294	pos
46 DTC 04	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,700300737	neg
46 DTC 05	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,913931887	neg
46 DTC 06	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,958906392	pos
46 DTC 07	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,839452461	neg
48 DTC 01	pN1	NP	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,303986165	neg
48 DTC 02	pN1	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,661703114	neg
50 DTC 01	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,678400288	neg
50 DTC 02	pN0	amp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,4539776	neg
51 DTC 01	pN1	n.d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA
52 DTC 01	pN0	n.d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,795968891	neg

Referenzgene: R1=ATGR; R2=BlueCone; R3=CACNA; R4=GRZB; R5=RUFY2; R6=SMYD1; NA=nicht auswertbar/nicht möglich; n.d.= nicht durchgeführt; pos=positiv; neg=negativ; amp=Amplifikation; 1=qPCR mit Primer funktioniert.

**Tabelle 43: B-RAF, N-RAS und Cyclin D1 in den Histologie-Subtypen**

Pat-ID	Histologie Subtyp	B-RAF			N-RAS			Cyclin D1 DTC
		PT	DTC	Met	PT	DTC	Met	
1	SSM	wt	wt		wt	wt		pos
2	SSM	wt	wt		wt	wt		neg
3	SSM	wt	wt		pos	pos		neg
4	NM	wt	pos	pos	NA	wt	wt	pos
5	ALM	wt	wt		NA	wt		pos
6	SSM	wt	wt		pos	wt		neg
7	SSM	wt	wt		wt	wt		neg
8	SSM	wt	wt		wt	wt		neg
9	sonstige	pos	wt		wt	wt		pos
10	SSM	wt	wt		wt	wt		NA
11	SSM	pos	wt	pos	pos	wt	wt	neg
12	SSM	wt	wt		wt	wt		neg
13	ALM	pos	wt		wt	pos		neg
14	SSM	wt	wt		wt	wt		neg
15	SSM	pos	wt		wt	wt		neg
16	SSM	wt	wt		pos	wt		neg
17	sonstige	pos	wt		wt	wt		NA
18	sonstige	wt			NA			
19	ALM	wt			wt			
20	sonstige	pos			wt			



## 10. Anhang

21	SSM	wt			wt			
22	SSM	wt			NA			
23	SSM	pos	wt		wt	NA		NA
24	SSM	pos	wt	pos	wt	wt	wt	NA
25	NM	pos	wt		wt	wt		neg
26	SSM	wt			wt			
27	SSM	wt	wt		wt	wt		neg
28	NM	pos	pos		wt	wt		neg
29	ALM	pos	wt	pos	wt	pos	wt	neg
30	NM	pos	wt		wt	wt		neg
31	NM	wt	wt		NA	wt		neg
32	ALM	wt	wt		wt	wt		neg
33	ALM	wt	wt		wt	wt		NA
34	sonstige	wt			wt			
35	SSM	pos	pos		wt	wt		neg
37	NM		wt			wt		neg
38	SSM		wt			pos		neg
40	sonstige		wt			pos		neg
41	SSM		wt			wt		neg
42	sonstige		wt			wt		neg
43	ALM		wt	wt		wt	wt	pos
44	NM		wt	wt		pos	wt	neg
45	NM		pos			pos		neg
46	SSM		wt			pos		pos
48	NM		wt			wt		neg
50	NM		wt			pos		neg
51	SSM		wt	pos		wt	wt	NA
52	NM		wt			wt		neg

*Sonstige=Sonderformen; wt=wildtyp; pos=positiv; neg=negativ; NA=nicht auswertbar*

**Tabelle 44: Mutationsvorkommen von B-RAF und N-RAS in den SSM**

A) SSM B-RAF	Proben			Patienten		
	mt	wt	Gesamt	pos	neg	Gesamt
PT	7 25 %	21 75 %	28	5 26,3 %	14 %	19
DTC	1 1,7%	59 98,3%	60	1 5 %	19 95 %	20
Met	4 36,4 %	7 63,6%	11	3 100 %	0	3
Summe	12 12,1%	87 87,9%	99	---	---	(23)
p-Wert PT vs. DTC	<b>p=0.001</b>			<b>p=0.09</b>		
DTC pN0	1 1,1 %	95 98,9 %	96			
DTC pN1	4 57,7 %	22 42,3 %	26			
p-Wert pN0 vs. pN1	<b>p=0.18</b>					

B) SSM N-RAS	Proben			Patienten		
	mt	wt	Gesamt	pos	neg	Gesamt
PT	4 15,4%	22 84,6%	26	4 22,2%	14 77,8%	18
DTC	4 6,8%	25 93,2%	59	4 21,2%	15 78,9%	19
Met	0	11 100,0%	11	0	3 100,0%	3
Summe	8 8,3%	88 91,7%	96	---	---	(23)
p-Wert PT vs. DTC	<b>p=1</b>			<b>p=1</b>		
DTC pN0	4 8,2%	45 91,8%	49			
DTC pN1	0	10 100,0%	10			

**A:** Mutationsvorkommen von den B-RAF Mutationen (mt) und dem B-RAF Wildtyp (wt) in den PT, DTC und Met auf Proben- und Patientenebene der SSM. **B:** Vorkommen der N-RAS Mutationen im Codon 61 (mt) und des Wildtyps (wt) in den PT, DTC und Met auf Proben- und Patientenebene der SSM. Ein Patient ist positiv, wenn eine Probe mutiert ist. (p-Wert mittels Vierfeldertest; Fisher Exakt Test; p-Wert two-tailed).

**Tabelle 45: Mutationsvorkommen von B-RAF und N-RAS in den NM**

A) NM B-RAF	Proben			Patienten		
	mt	wt	Gesamt	pos	neg	Gesamt
PT	6 50%	6 50%	12	3 60%	2 40%	5
DTC	4 13,8%	25 86,2%	29	3 27,3%	8 72,7%	11
Met	2 11,1%	16 88,9%	18	1 50%	1 50%	2
Summe	12 20,3%	47 79,7%	59	---	---	(11)
p-Wert PT vs. DTC	p=0.02			p=0.3		
DTC pN0	1 5,9%	16 94,1%	17			
DTC pN1	3 25%	9 75%	12			
p-Wert pN0 vs. pN1	p=0.28					

B) NM N-RAS	Proben			Patienten		
	mt	wt	Gesamt	pos	neg	Gesamt
PT	0	8 100%	8	0	3 100%	3
DTC	3 10,7%	25 89,3%	28	3 27,3%	8 72,7%	11
Met	0	18 100%	18	0	2 100%	2
Summe	3 5,6%	51 94,4%	54	---	---	(11)
p-Wert PT vs. DTC	p=0.58			p=0.55		
DTC pN0	3 18,8%	13 81,2%	16			
DTC pN1	0	12 100%	12			
p-Wert pN0 vs. pN1	p=0.24					

**A:** Mutationsvorkommen von den B-RAF Mutationen (mt) und dem B-RAF Wildtyp (wt) in den PT, DTC und Met auf Proben- und Patientenebene der NM. **B:** Vorkommen der N-RAS Mutationen im Codon 61 (mt) und des Wildtyps (wt) in den PT, DTC und Met auf Proben- und Patientenebene der NM. Ein Patient ist positiv, wenn eine Probe mutiert ist. (p-Wert mittels Vierfeldertest; Fisher Exakt Test; p-Wert two-tailed).

**Tabelle 46: Mutationsvorkommen von B-RAF und N-RAS in den ALM.**

A) ALM B-RAF	Proben			Patienten		
	mt	wt	Gesamt	pos	neg	Gesamt
PT	3 27,3%	8 72,7%	11	2 33,3%	4 76,7%	6
DTC	0	15 100,0%	15	0	6 100%	6
Met	1 25%	3 75,0%	4	1 50%	1 50%	2
Summe	4 13,3%	26 86,7%	30	---	---	(7)
p-Wert PT vs. DTC	p=0.06			p=0.45		
DTC pN0	0	13 100%	13			
DTC pN1	0	2 100%	2			
p-Wert pN0 vs. pN1	p=1					

B) ALM N-RAS	Proben			Patienten		
	mt	wt	Gesamt	pos	neg	Gesamt
PT	0	10 100%	10	0	5 100%	5
DTC	2 15,4%	11 84,6%	13	1 16,7%	5 83,3%	6
Met	0	4 100%	4	0	2 100%	2
Summe	2 7,4%	25 92,6%	27	---	---	(7)
p-Wert PT vs. DTC	p=0.49			p=1		
DTC pN0	1 9,1%	10 90,9%	11			
DTC pN1	1 50%	1 50%	2			
p-Wert pN0 vs. pN1	p=0.29					

**A:** Mutationsvorkommen von den B-RAF Mutationen (mt) und dem B-RAF Wildtyp (wt) in den PT, DTC und Met auf Proben- und Patientenebene der ALM. **B:** Vorkommen der N-RAS Mutationen im Codon 61 (mt) und des Wildtyps (wt) in den PT, DTC und Met auf Proben- und Patientenebene der ALM. Ein Patient ist positiv, wenn eine Probe mutiert ist. (p-Wert mittels Vierfeldertest; Fisher Exakt Test; p-Wert two-tailed).

**Tabelle 47: Auswertung der B-RAF und N-RAS Ergebnisse für die Triplet-Gruppe.**

A) B-RAF Triplet-Gruppe	Proben			Patienten		
	mt	wt	Gesamt	pos	neg	Gesamt
PT	6 60 %	4 40 %	10	3 75 %	1 25 %	4
DTC	2 16,7 %	10 83,3 %	12	1 25 %	3 75 %	4
Met	5 33,3 %	10 66,7 %	15	4 100 %	0	4
Summe	13	24	37	---	---	4
p-Wert*	p=0.095					

B) N-RAS Triplet Gruppe	Proben			Patienten		
	mt	wt	Gesamt	pos	neg	Gesamt
PT	1 14 %	6 86 %	7	1 25 %	2 75 %	3
DTC	1 8,3 %	11 91,7 %	12	1 25 %	3 75 %	4
Met	0	13 100 %	13	0	4 100 %	4
Summe	13	24	37	---	---	4
p-Wert*	p=0.5					

**A:** Mutationsvorkommen von den B-RAF Mutationen (mt) und dem B-RAF Wildtyp (wt) in den PT, DTC und Met auf Proben- und Patientenebene der Triplet-Gruppe. **B:** Vorkommen der N-RAS Mutationen im Codon 61 (mt) und des Wildtyps (wt) in den PT, DTC und Met auf Proben- und Patientenebene der Triplet-Gruppe. Ein Patient ist positiv, wenn eine Probe mutiert ist. (\*p-Wert mittels 6 Feldertest; Fisher Exakt Test; p-Wert two-tailed).

**Tabelle 48: Die B-RAF-Mutation in den klinischen Parametern von PT, DTC und Met**

B-RAF	PT				DTC				Met			
	n	mt	%	p=	n	mt	%	p=	n	mt	%	p=
Gesamt	35	13	37,1		41	4	9,8		7	5	71,4	
Geschlecht	35			0.28*	41			0.29*	7			-
Männer	22	10	45,5		28	4	14,3		7	5	71,4	
Frauen	13	3	23,1		13	0	0		0	0	0	
Histologie	35			0.36***	41			0.12*	7			0.43**
SSM	19	5	26,3		20	1	5		3	3	100	
NM	5	3	60		11	3	27,3		2	1	50	
ALM	6	2	33,3		6	0	0		2	1	50	
sonstige	5	3	60		4	0	0		0	0	0	
Alter bei PT-OP	35			0.43***	41			1**	7			0.62***
<40 Jahre	6	4	66,7		8	0	0		2	1	50	
41-60 Jahre	9	3	33,3		11	1	9,1		1	1	100	
61-70 Jahre	12	3	25		12	2	16,7		2	2	100	
>71 Jahre	8	3	37,5		10	1	10		2	1	50	
Lokalisation	35			0.16**	41			-	7			1*
Gesicht oder Kopf	0	0	0		1	0	0		1	0	0	
obere Extremitäten	8	1	12,5		9	0	0		1	0	0	

## 10. Anhang

B-RAF	PT				DTC				Met			
	n	mt	%	p=	n	mt	%	p=	n	mt	%	p=
<b>Gesamt</b>	<b>35</b>	<b>13</b>	<b>37,1</b>		<b>41</b>	<b>4</b>	<b>9,8</b>		<b>7</b>	<b>5</b>	<b>71,4</b>	
<b>Rumpf</b>	15	8	53,3		16	4	25		4	4	100	
<b>untere Extremitäten</b>	12	4	33,3		15	0	0		1	1	100	
<b>Breslow</b>	35			0.99**	41			0.3*	7			0.33**
<b>pT1 (0-1,00 mm)</b>	1	0	0		2	0	0		0	0	0	
<b>pT2 (1,01-2,00 mm)</b>	18	7	38,9		19	0	0		2	2	100	
<b>pT3 (2,01-4,00 mm)</b>	6	2	33,3		10	1	10		2	1	20	
<b>pT4 (&gt; 4,0 mm)</b>	9	4	44,4		9	3	33,3		2	2	100	
<b>k.A.</b>	1	0	0		1	0	0		1	0	0	
<b>Lymphknotenstatus</b>	35			0.12*	41			0.13*	7			0.14*
<b>pN0</b>	27	8	29,6		34	2	5,9		3	1	33,3	
<b>pN1</b>	8	5	62,5		7	2	28,6		4	4	100	
<b>Clark-Level</b>	35			0.61**	41			0.56*	7			1**
<b>I</b>	0	0	0		0	0	0		0	0	0	
<b>II</b>	0	0	0		0	0	0		0	0	0	
<b>III</b>	11	3	27,3		13	0	0		1	1	100	
<b>IV</b>	15	7	46,7		19	2	10,5		3	2	66,7	
<b>V</b>	8	3	37,5		8	2	25		2	2	100	
<b>k.A.</b>	1	0	0		1	0	0		1	0	0	
<b>Ulzeration</b>	35			0.02*	41			0.07*	7			0.43*
<b>ja</b>	10	7	70		12	3	25		3	3	100	
<b>nein</b>	25	6	24		29	1	3,4		4	2	50	
<b>Regression</b>	35			0.54*	41			1*	7			1*
<b>ja</b>	3	2	66,7		4	0	0		1	1	100	
<b>nein</b>	32	11	34,4		37	4	10,8		6	4	66,7	
<b>Sonnen-Exposition</b>	35			1*	41			0.51*	7			0.33*
<b>CSD</b>	0	0	0		1	0	0		1	0	0	
<b>Non-CSD</b>	29	11	38		34	4	11,8		4	4	100	
<b>AM</b>	6	2	33,3		6	0	0		2	1	50	

Aufstellung der B-RAF Mutationen (mt) in den einzelnen Untergruppen des malignen Melanoms. n=Anzahl der Patienten. p-Werte mittels Fisher Exakt Test \*2x2 two-tailed, \*\*2x3 und \*\*\*2x4  $P_B$ =two-tailed. Grau = die Faktoren mit zu geringer Anzahl für eine statistische Auswertung, wurden für die p-Wert Berechnungen nicht mit einbezogen.

**Tabelle 49: Die N-RAS Mutation in den klinischen Parametern von PT, DTC und Met**

N-RAS	PT					DTC					Met				
	n	NA	mt	%	p=	n	NA	mt	%	p=	n	NA	mt	%	p=
<b>Gesamt</b>	<b>35</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>13,3</b>		<b>41</b>	<b>1</b>	<b>9</b>	<b>22,5</b>		<b>7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
<b>Geschlecht</b>	35				0.27*	41				0.69*	7				
<b>Männer</b>	22	4	1	5,6		28	1	7	26		7	0	0	0	
<b>Frauen</b>	13	1	3	25		13	0	2	15,4		0	0	0	0	
<b>Histologie</b>	35				-	41				0.94***	7				
<b>SSM</b>	18	1	4	23,5		20	1	4	21,1		3	0	0	0	
<b>NM</b>	3	2	0	0		11	0	3	27,3		2	0	0	0	
<b>ALM</b>	5	1	0	0		6	0	1	16,7		2	0	0	0	
<b>sonstige</b>	4	1	0	0		4	0	1	25		0	0	0	0	
<b>Alter bei PT-OP</b>	35				0.57*	41				0.27**	7				

## 10. Anhang

N-RAS	PT					DTC					Met				
	n	NA	mt	%	p=	n	NA	mt	%	p=	n	NA	mt	%	p=
<b>Gesamt</b>	<b>35</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>13,3</b>		<b>41</b>	<b>1</b>	<b>9</b>	<b>22,5</b>		<b>7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
<b>&lt;40 Jahre</b>	6	2	0	0		8	0	0	0		2	0	0	0	
<b>41-60 Jahre</b>	9	1	1	12,5		11	1	1	10		1	0	0	0	
<b>61-70 Jahre</b>	12	2	0	0		12	0	4	33,3		2	0	0	0	
<b>&gt;71 Jahre</b>	8	0	3	37,5		10	0	4	40		2	0	0	0	
<b>Lokalisation</b>	35				1*	41				0.45***	7				
<b>Gesicht oder Kopf</b>	0	0	0	0		1	0	1	100		1	0	0	0	
<b>obere Extremitäten</b>	8	1	0	0		9	0	2	22,2		1	0	0	0	
<b>Rumpf</b>	15	2	2	15,4		16	1	3	20		4	0	0	0	
<b>untere Extremitäten</b>	12	2	2	20		15	0	3	20		1	0	0	0	
<b>Breslow</b>	35				1*	41				0.02***	7				
<b>pT1 (0-1,00 mm)</b>	1	0	0	0		2	0	1	50		0	0	0	0	
<b>pT2 (1,01-2,00 mm)</b>	18	3	3	20		19	1	1	5,6		2	0	0	0	
<b>pT3 (2,01-4,00 mm)</b>	6	0	1	16,7		10	0	5	50		2	0	0	0	
<b>pT4 (&gt; 4,0 mm)</b>	9	2	0	0		9	0	2	22,2		2	0	0	0	
<b>k.A.</b>	1	0	0	0		1	0	0	0		1	0	0	0	
<b>Lymphknotenstatus</b>	35				1*	41				1*	7				
<b>pN0</b>	27	4	3	13		34	0	8	23,5		3	0	0	0	
<b>pN1</b>	8	1	1	14,3		7	1	1	16,7		4	0	0	0	
<b>Clark-Level</b>	35				1*	41				0.79**	7				
<b>I</b>	0	0	0	0		0	0	0	0		0	0	0	0	
<b>II</b>	0	0	0	0		0	0	0	0		0	0	0	0	
<b>III</b>	11	2	2	22,2		13	0	2	15,4		1	0	0	0	
<b>IV</b>	15	1	2	14,3		19	1	5	27,8		3	0	0	0	
<b>V</b>	8	2	0	0		8	0	2	25		2	0	0	0	
<b>k.A.</b>	1	0	0	0		1	0	0	0		1	0	0	0	
<b>Ulzeration</b>	35				0.29*	41				1*	7				
<b>ja</b>	10	1	0	0		12	1	2	18,2		3	0	0	0	
<b>nein</b>	25	4	4	19		29	0	7	24,1		4	0	0	0	
<b>Regression</b>	35				1*	41				1*	7				
<b>ja</b>	3	0	0	0		4	1	1	33,3		1	0	0	0	
<b>nein</b>	32	5	4	14,8		37	0	8	21,6		6	0	0	0	
<b>Sonnen-Exposition</b>	35				1*	41				0.14**	7				
<b>CSD</b>	0	0	0	0		1	0	1	100		1	0	0	0	
<b>Non-CSD</b>	29	4	4	16		34	1	6	18,2		4	0	0	0	
<b>AM</b>	6	1	0	0		6	0	2	33,3		2	0	0	0	

Aufstellung der N-RAS Mutationen (mt) in den einzelnen Untergruppen des malignen Melanoms. n=Anzahl der Patienten. p-Werte mittels Fisher Exakt Test \*2x2 two-tailed, \*\*2x3 und \*\*\*2x4  $P_B$ =two-tailed. Grau = die Faktoren mit zu geringer Anzahl für eine statistische Auswertung, wurden für den p-Wert Berechnung nicht mit einbezogen.

**Tabelle 50: Cyclin D1 Amplifikation in den klinischen Parametern der DTC**

CCND1	DTC				
	n	NA	amp	%	p=
<b>Gesamt</b>	<b>41</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>17,1</b>	
<b>Geschlecht</b>	41				1*
<b>Männer</b>	28	5	4	17,4	
<b>Frauen</b>	13	1	2	16,7	
<b>Histologie</b>	41				0.26***
<b>SSM</b>	20	4	2	12,5	
<b>NM</b>	11	0	1	9,1	
<b>ALM</b>	6	1	2	40	
<b>sonstige</b>	4	1	1	33,3	
<b>Alter bei PT-OP</b>	41				0.6**
<b>&lt;40 Jahre</b>	8	2	2	33,3	
<b>41-60 Jahre</b>	11	4	0	0	
<b>61-70 Jahre</b>	12	0	3	25	
<b>&gt;71 Jahre</b>	10	0	1	10	
<b>Lokalisation</b>	41				0.72**
<b>Gesicht oder Kopf</b>	1	0	0	0	
<b>obere Extremitäten</b>	9	2	2	28,6	
<b>Rumpf</b>	16	3	2	14,3	
<b>untere Extremitäten</b>	15	1	2	14,3	
<b>Breslow</b>	41				0.62*
<b>pT1 (0-1,00 mm)</b>	2	0	0	0	
<b>pT2 (1,01-2,00 mm)</b>	19	4	4	26,7	
<b>pT3 (2,01-4,00 mm)</b>	10	1	0	0	
<b>pT4 (&gt; 4,0 mm)</b>	9	1	1	12,5	
<b>k.A.</b>	1	0	1	100	
<b>Lymphknotenstatus</b>	41				1*
<b>pN0</b>	34	4	5	16,7	
<b>pN1</b>	7	2	1	20	
<b>Clark-Level</b>	41				0.316***
<b>I</b>	0	0	0	0	
<b>II</b>	0	0	0	0	
<b>III</b>	13	1	2	16,7	
<b>IV</b>	19	4	2	13,3	
<b>V</b>	8	1	1	14,3	
<b>k.A.</b>	1	0	1	100	
<b>Ulzeration</b>	41				0.649*
<b>ja</b>	12	2	1	9,1	
<b>nein</b>	29	4	5	20	
<b>Regression</b>	41				1*
<b>ja</b>	4	1	0	0	
<b>nein</b>	37	5	6	18,8	
<b>Sonnen-Exposition</b>	41				0.205*



CCND1	DTC				
	n	NA	amp	%	p=
<b>Gesamt</b>	<b>41</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>17,1</b>	
CSD	1	0	0	0	
Non-CSD	34	5	4	13,8	
AM	6	1	2	40	

Aufstellung der Cyclin D1 Amplifikation (amp) in den einzelnen Untergruppen des malignen Melanoms. n=Anzahl der Patienten und NA=nicht detektierbar. p-Werte mittels Fisher Exakt Test \*2x2 two-tailed, \*\*2x3 und \*\*\*2x4  $P_B$ =two-tailed. Grau = die Faktoren mit zu geringer Anzahl für eine statistische Auswertung, wurden für den p-Wert Berechnung nicht mit einbezogen.

## 10.3 Abbildungen

### 10.3.1 CGH-Ideogramme

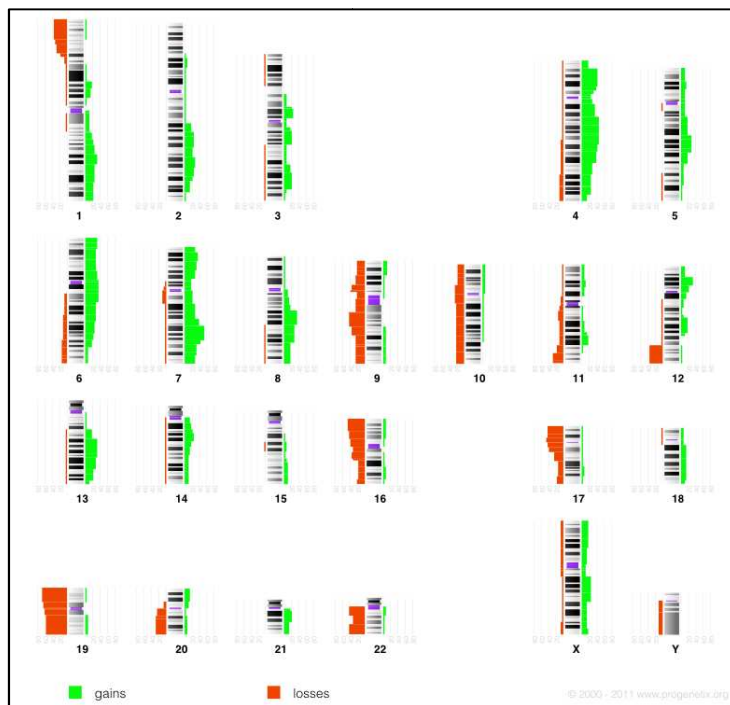
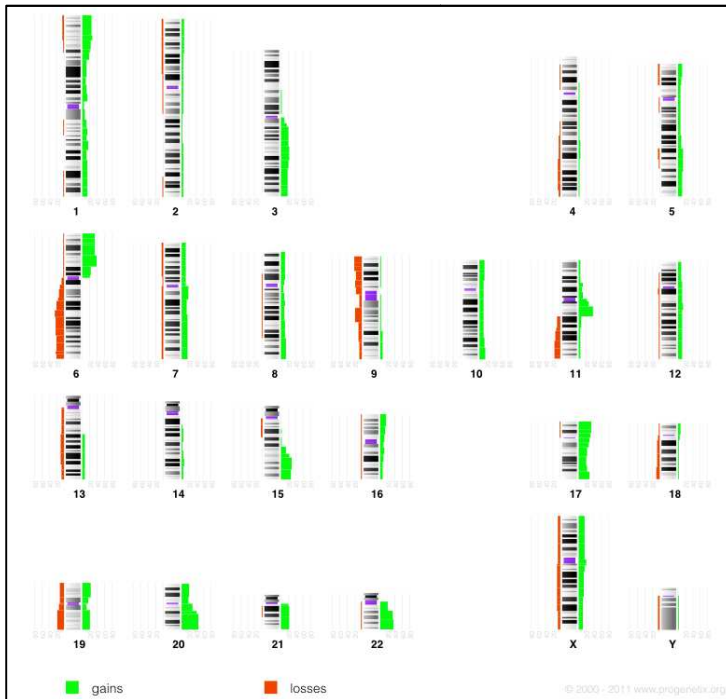
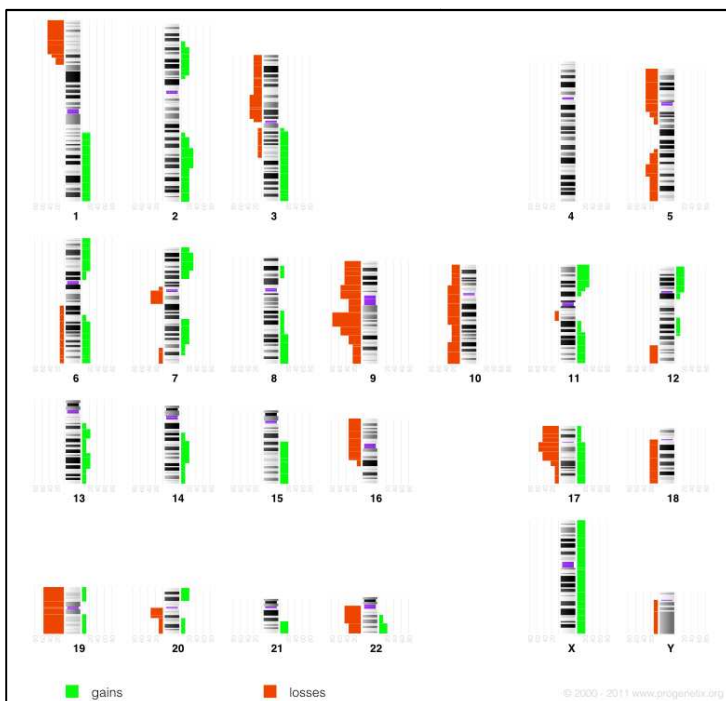


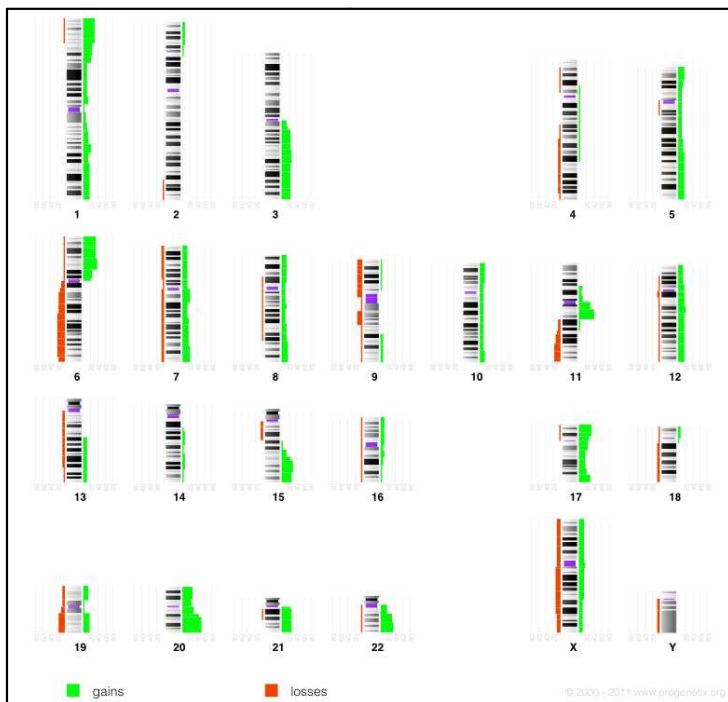
Abbildung 46: Ideogramm der PT (n=28)



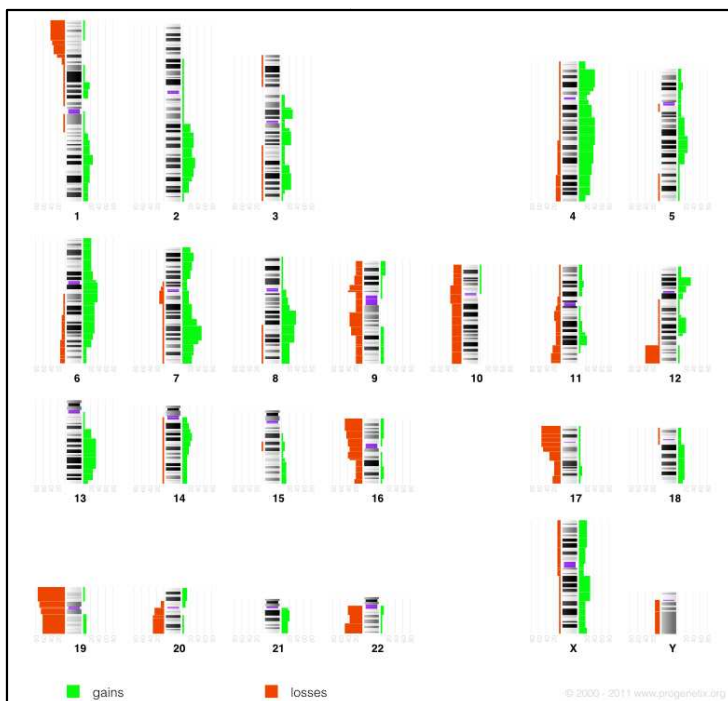
**Abbildung 47: Ideogramm der DTC (n=44; inkl. NP)**



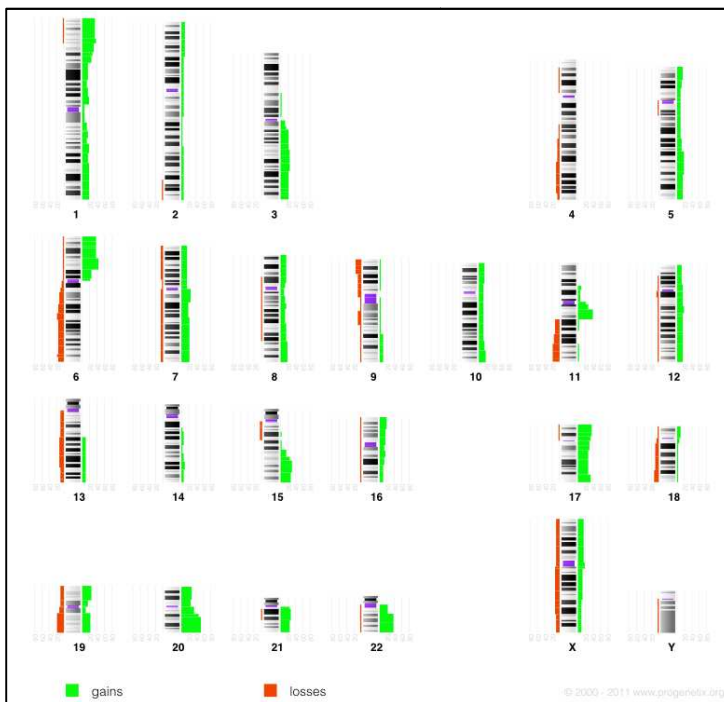
**Abbildung 48: Ideogramm der Metastasen (n=9)**



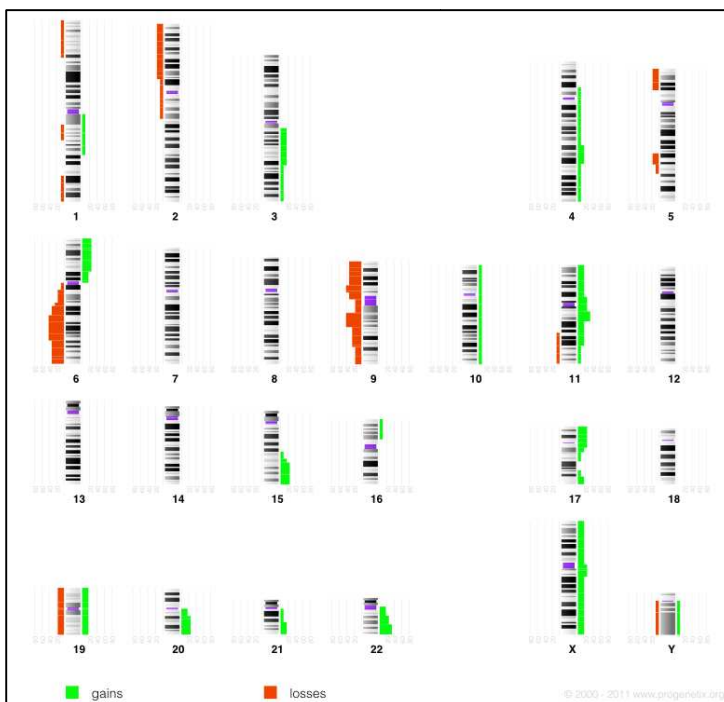
**Abbildung 49: Ideogramm DTC der Paare (n=23, inkl. NP)**



**Abbildung 50: Ideogramm der PT-Paare (n=23)**



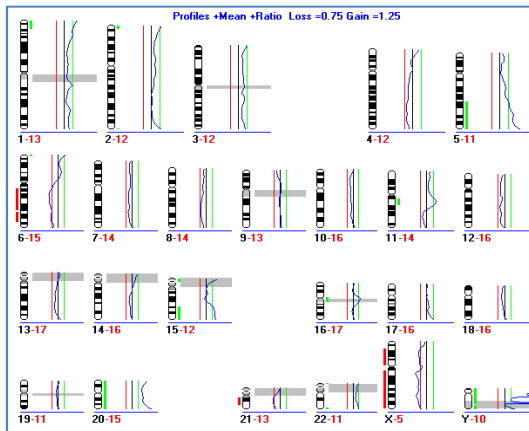
**Abbildung 51: Ideogramm der DTC pN0 (n=32; inkl. NP)**



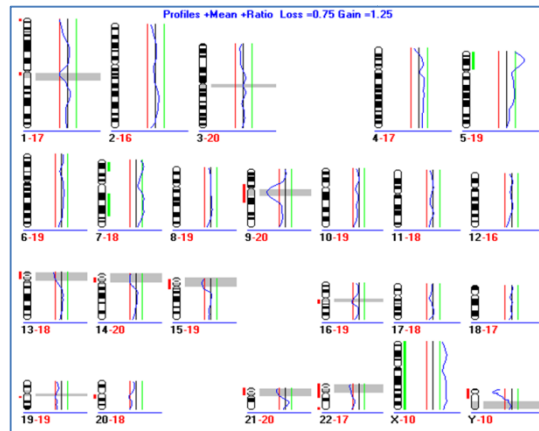
**Abbildung 52: Ideogramm der DTC pN1 (n=12; inkl. NP)**

## 10.3.2 CGH-Profil des Melanom Kollektivs

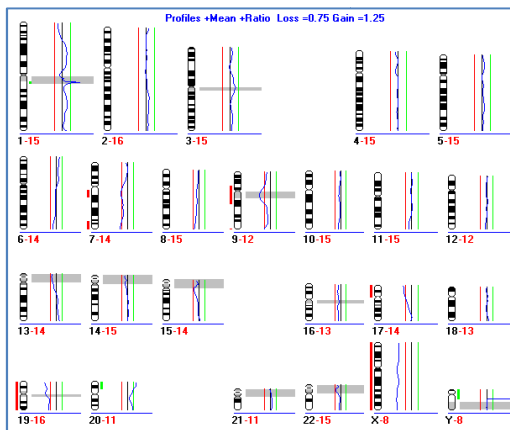
01 DTC 01



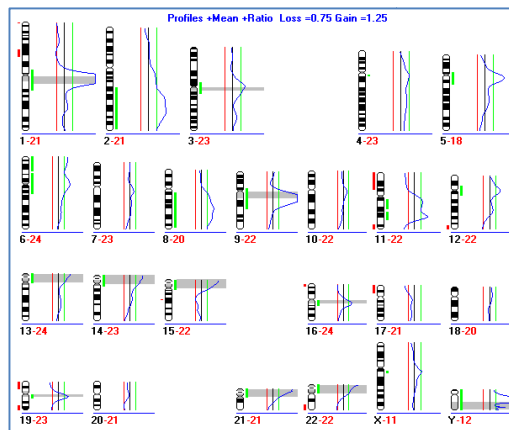
01 PT 01



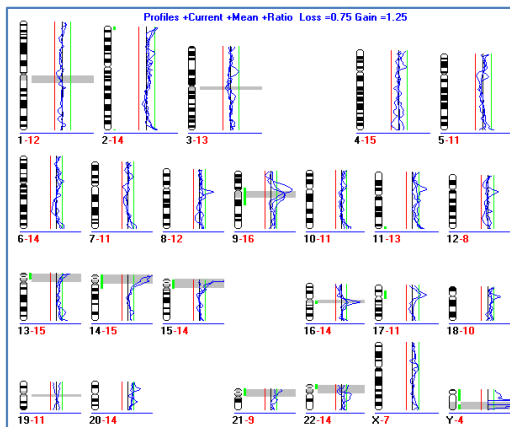
02 DTC 01



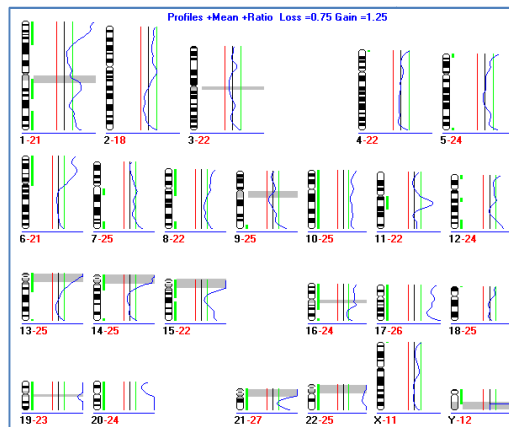
02 PT 01



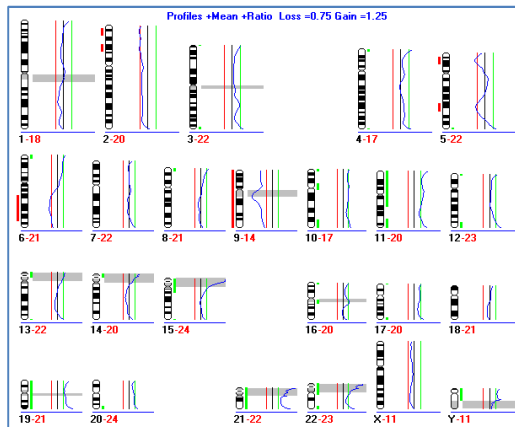
03 DTC 03



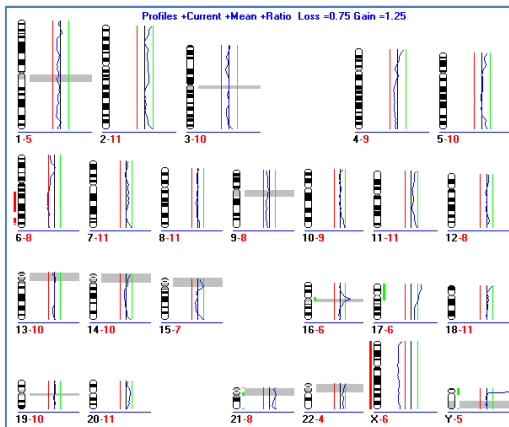
03 DTC 05



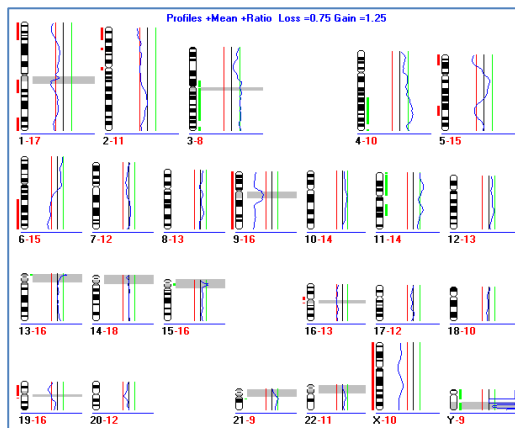
04 DTC 01



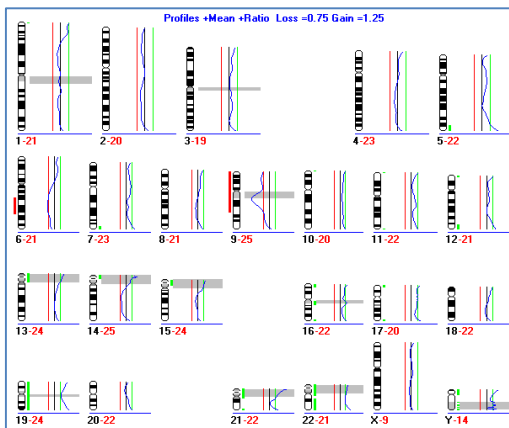
04 DTC 02



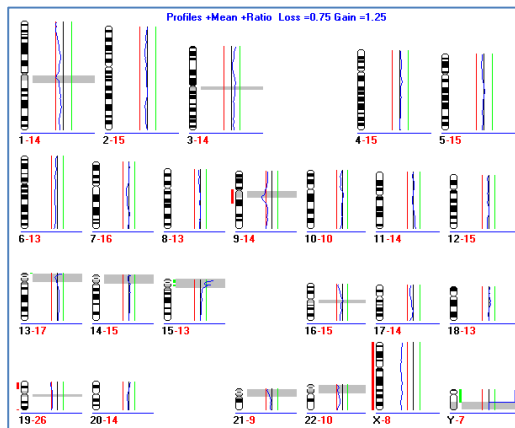
04 DTC 03



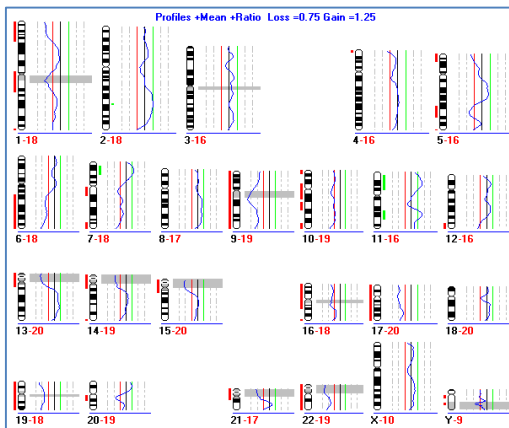
04 DTC 04



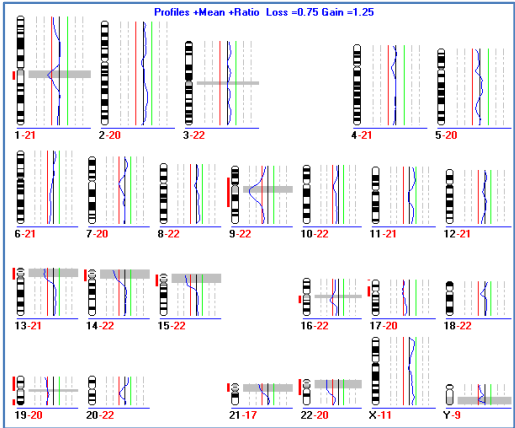
04 DTC 06



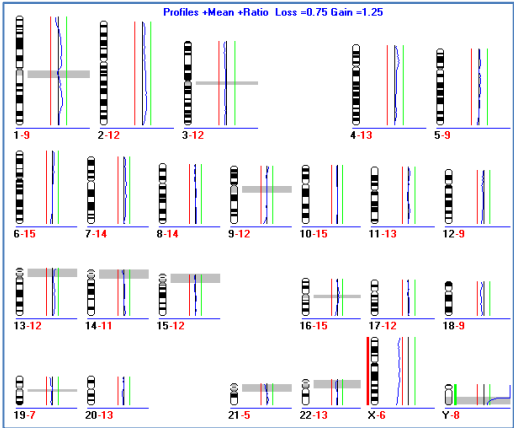
04 Met 02



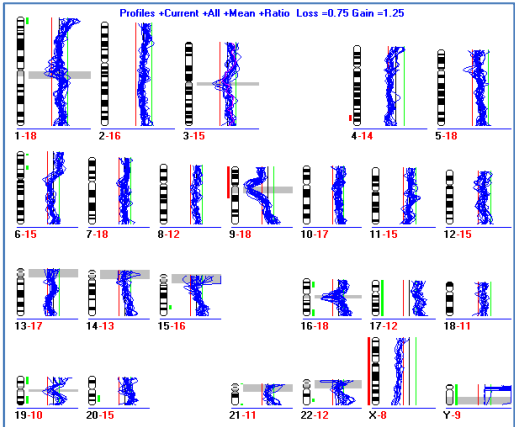
04 Met 03



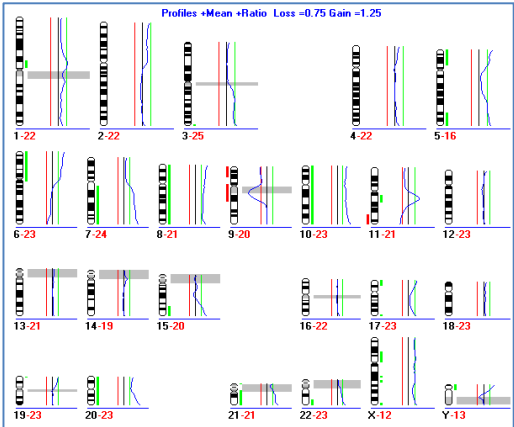
05 DTC 01



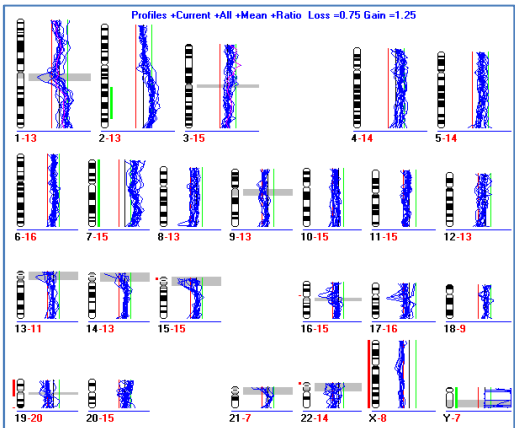
05 PT 01



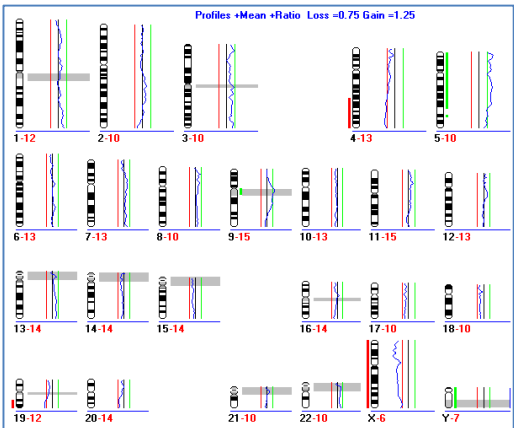
07 DTC 02



07 PT 01

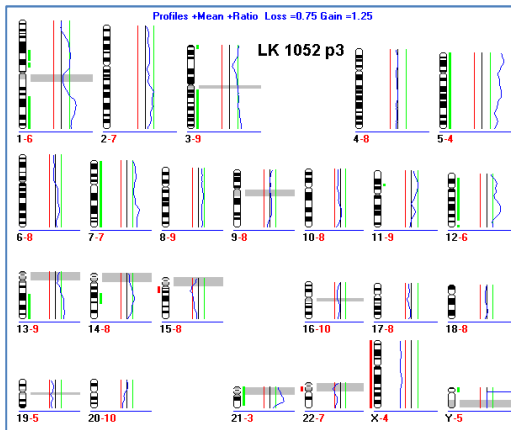


08 DTC 01

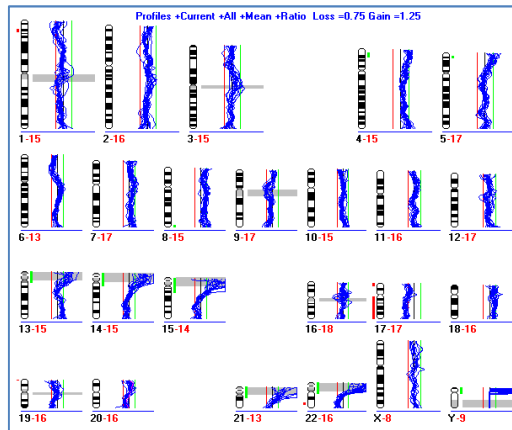


## 10. Anhang

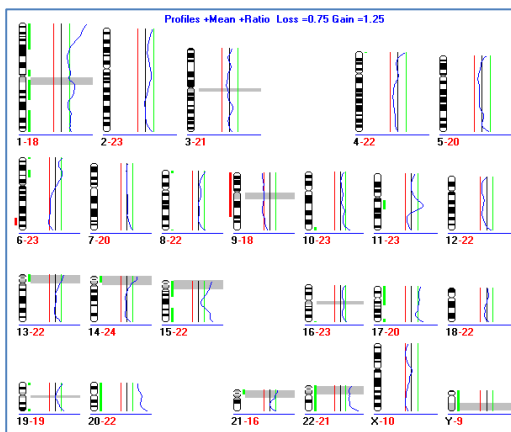
### 08 DTC 03



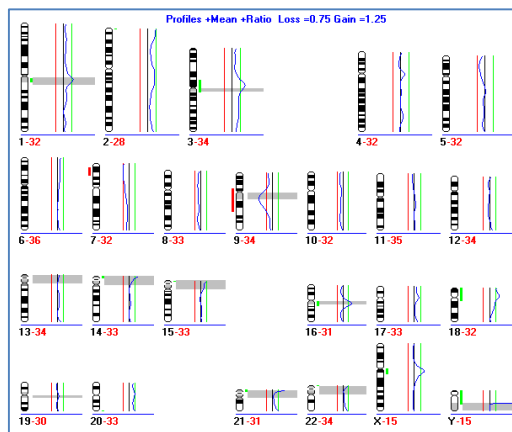
### 08 PT 01



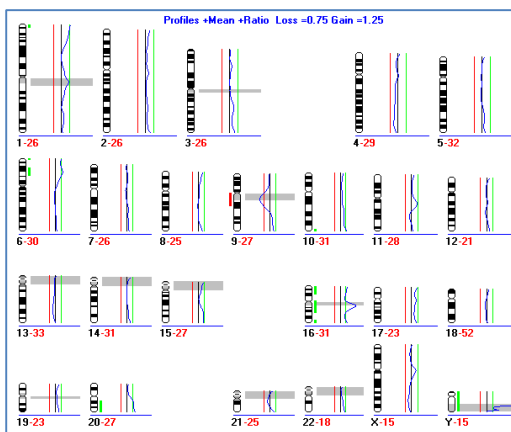
### 09 DTC 01



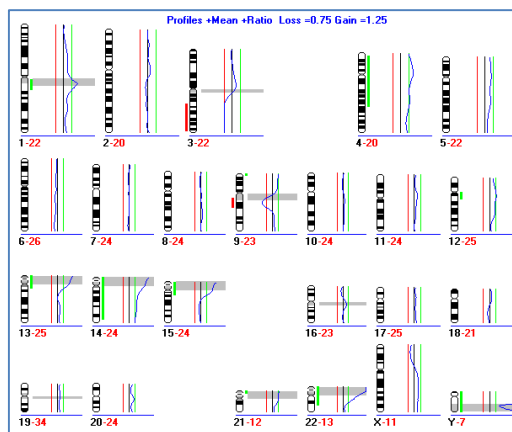
### 09 DTC 02



### 09 DTC 03



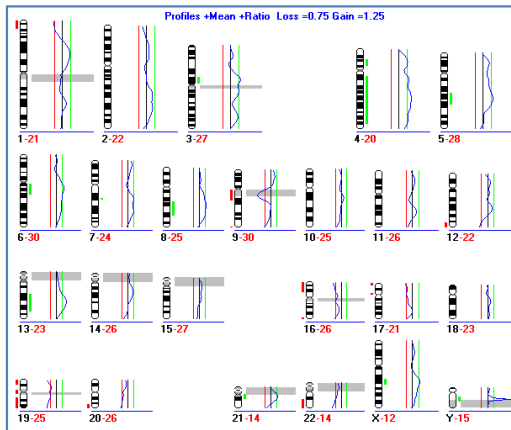
### 09 PT 02



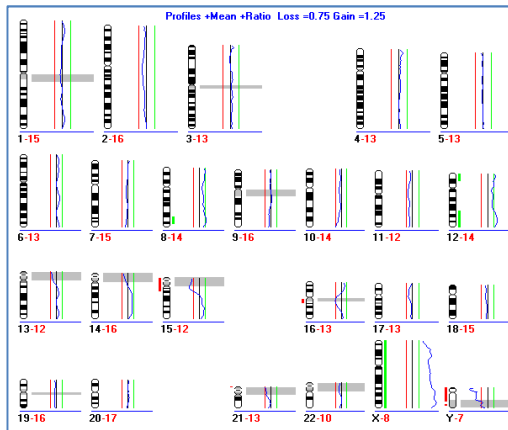


## 10. Anhang

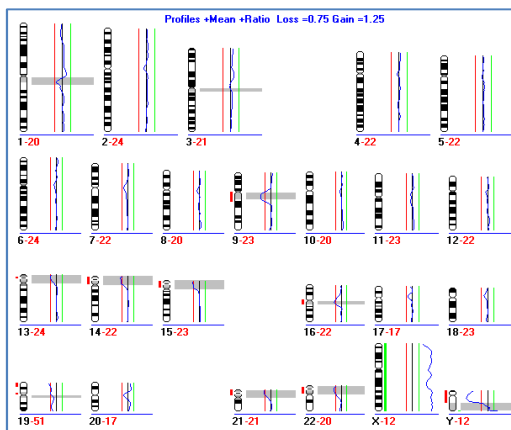
### 09 PT 03



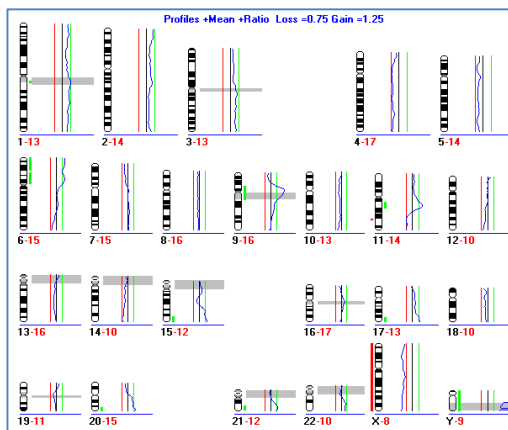
### 10 DTC 01



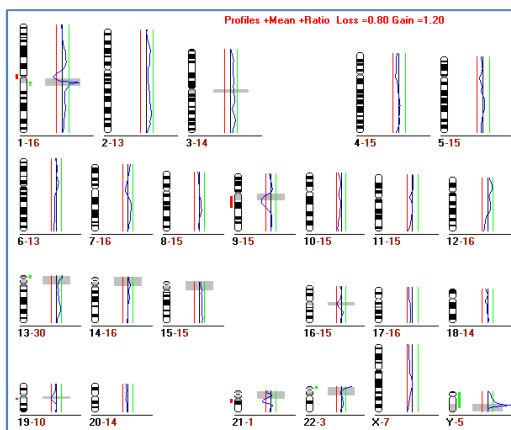
### 10 PT 01



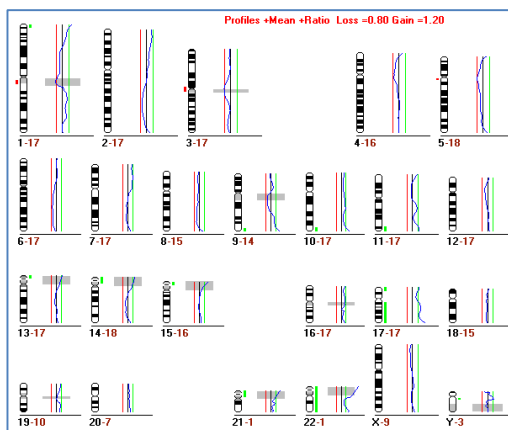
### 11 DTC 01



### 11 Met 01

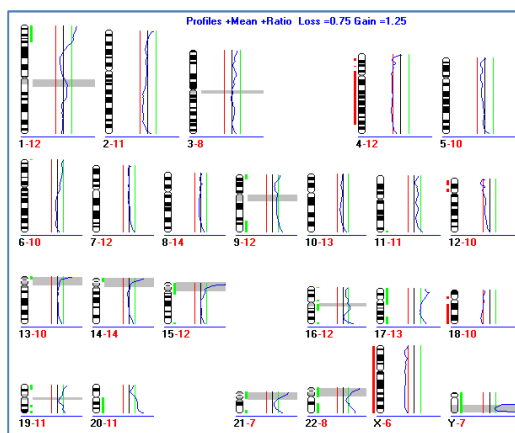


### 11 Met 02

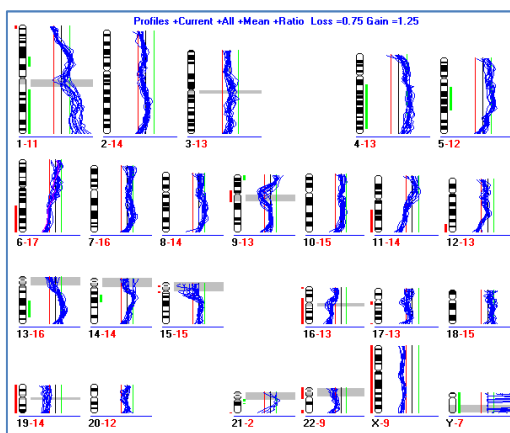


## 10. Anhang

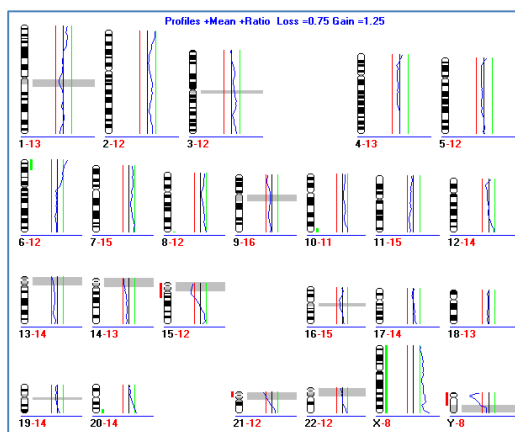
### 12 DTC 02



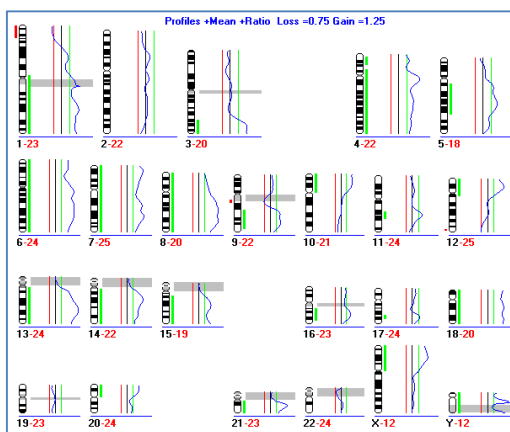
### 12 PT 01



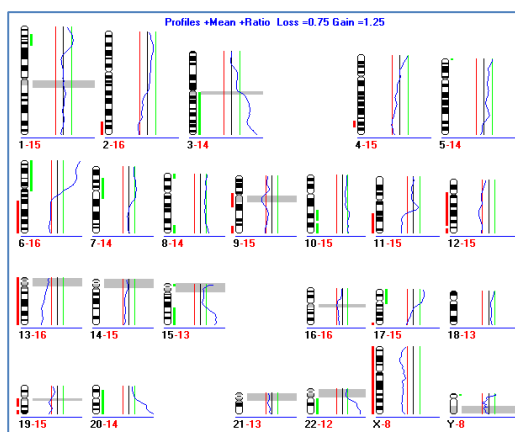
### 13 DTC 02



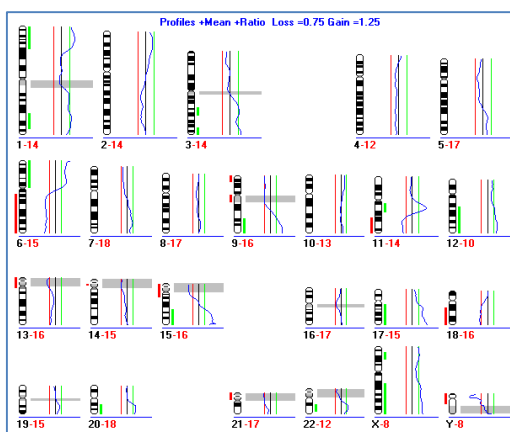
### 13 PT 01



### 14 DTC 02

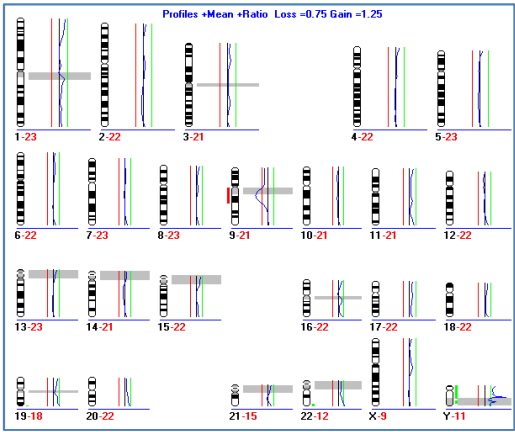


### 15 DTC 01

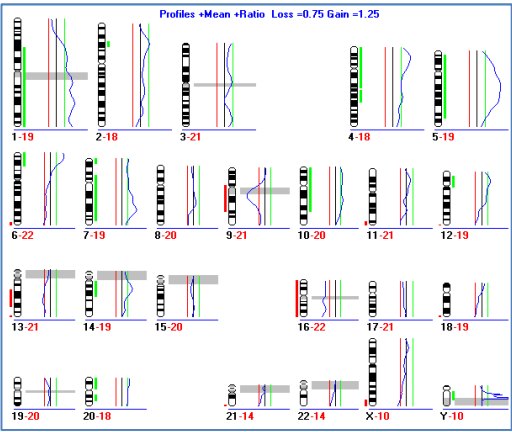


10. Anhang

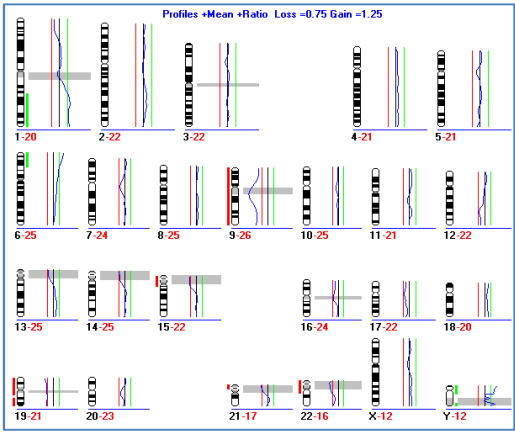
16 DTC 01



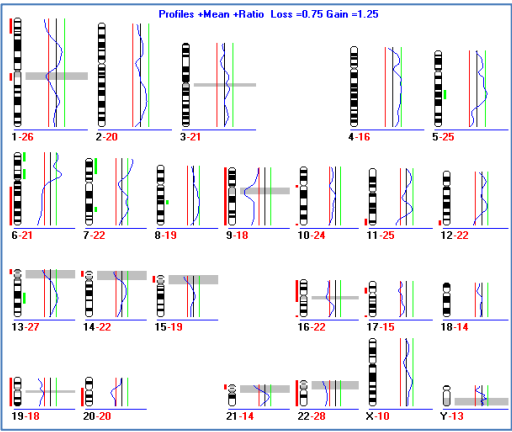
16 PT 01



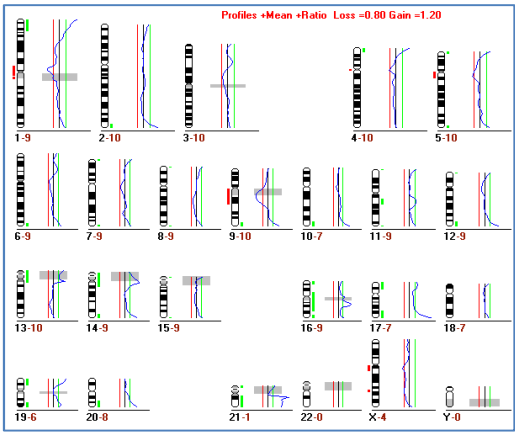
16 PT 02



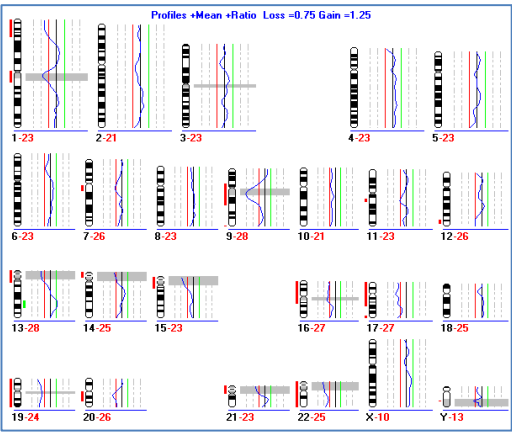
17 PT 01



24 DTC 01

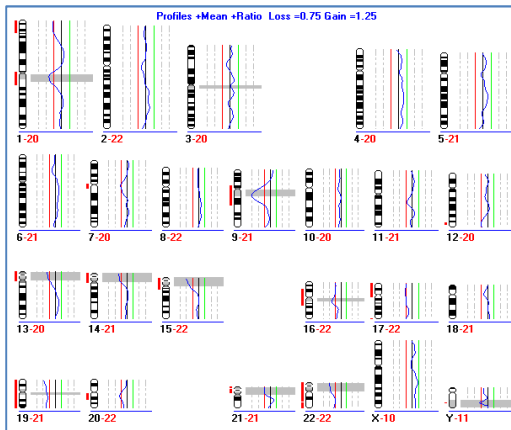


24 Met 01

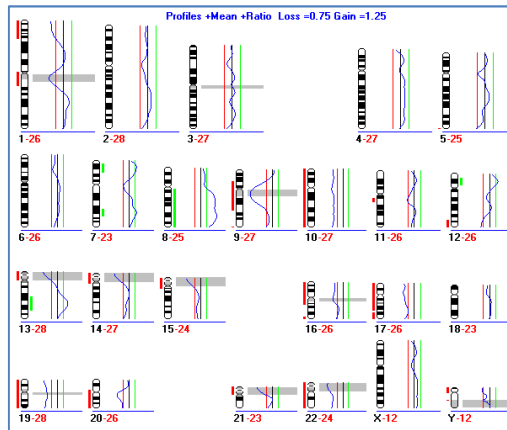


## 10. Anhang

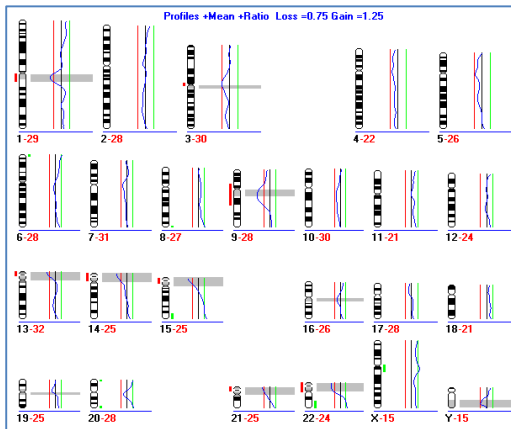
### 24 Met 02



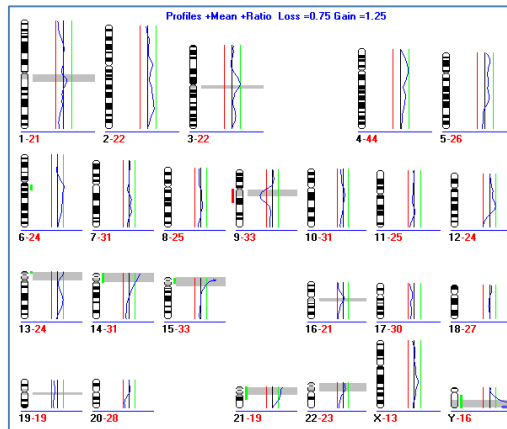
### 24 PT 02



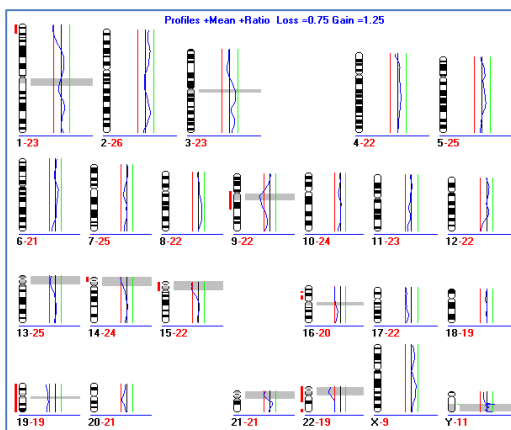
### 25 DTC 03



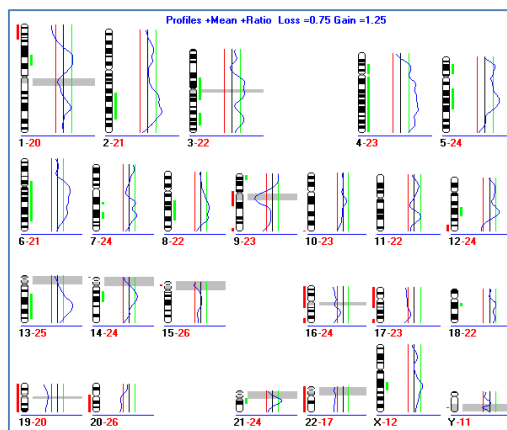
### 26 PT 02



### 27 DTC 02

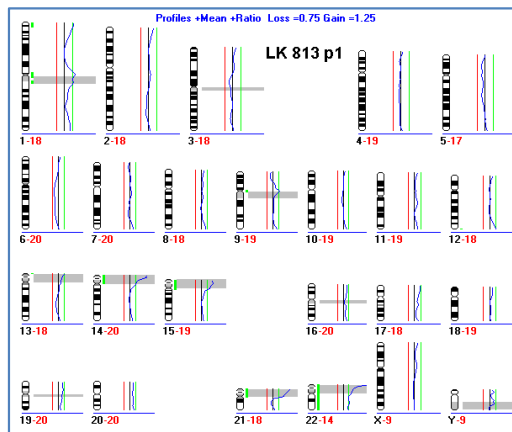


### 27 PT 01

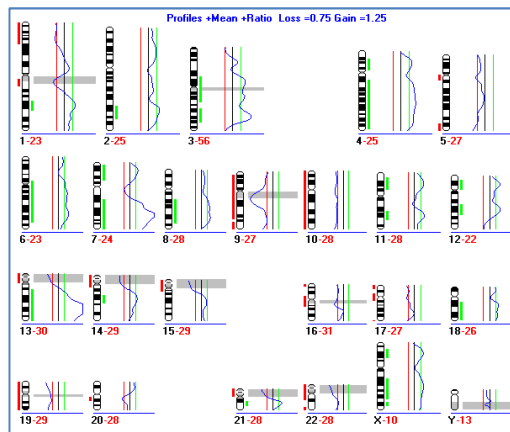


## 10. Anhang

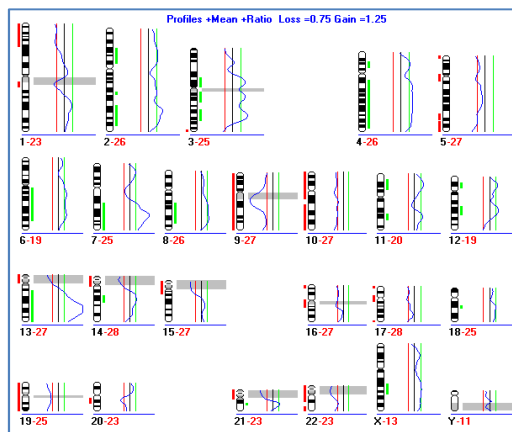
### 28 DTC 01



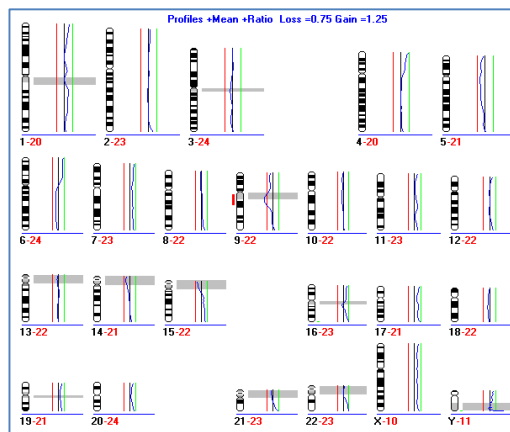
### 28 PT 01



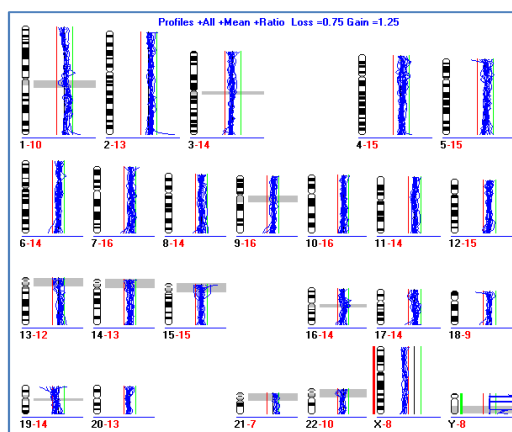
### 28 PT 02



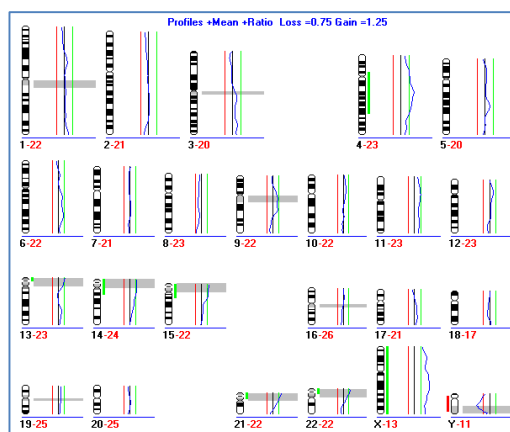
### 29 DTC 01



### 29 DTC 02

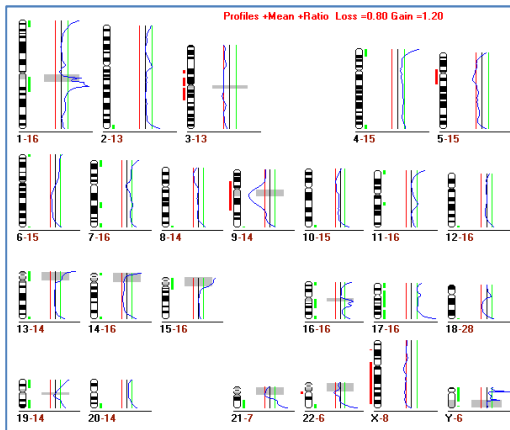


### 29 DTC 03

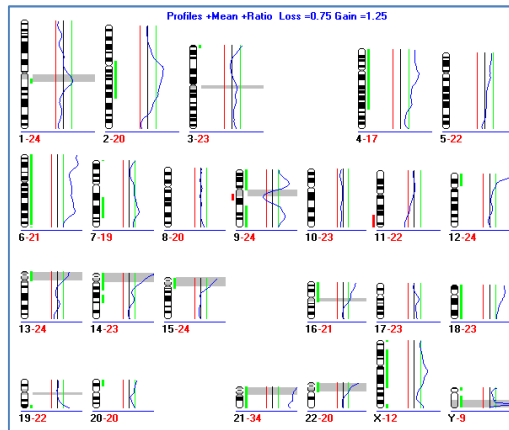


## 10. Anhang

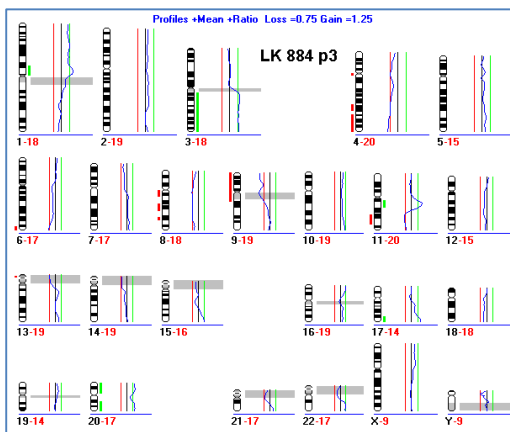
### 29 Met 01



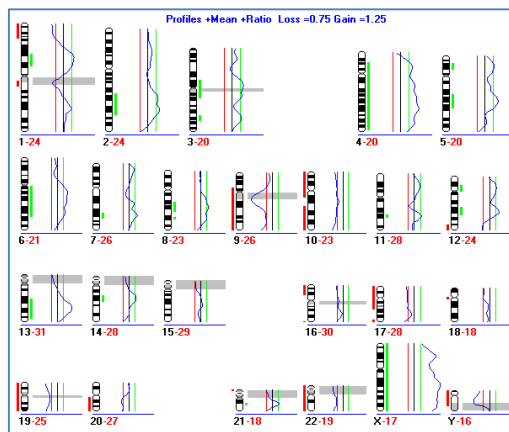
### 29 PT 01



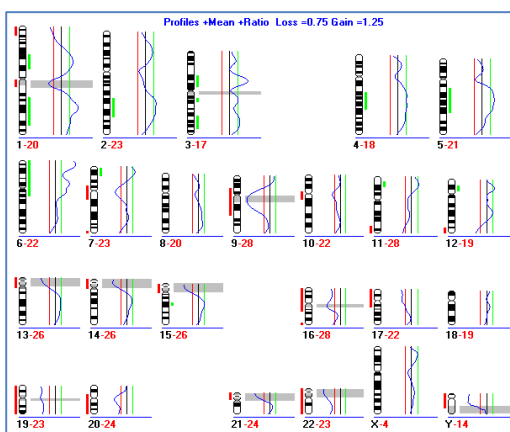
### 30 DTC 03



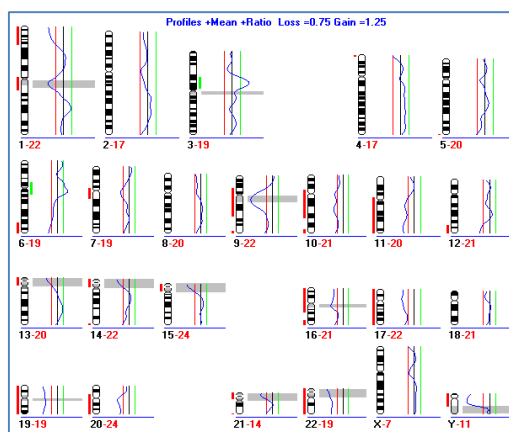
### 30 PT 02



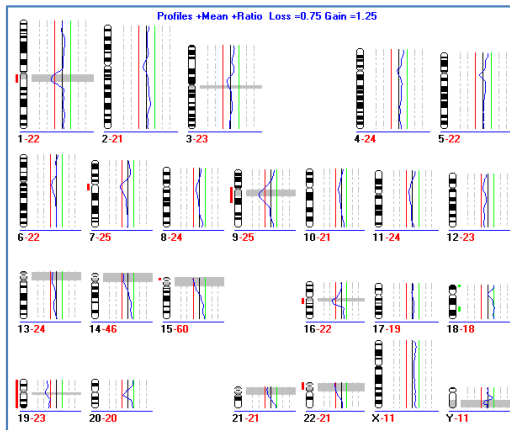
### 30 PT 03



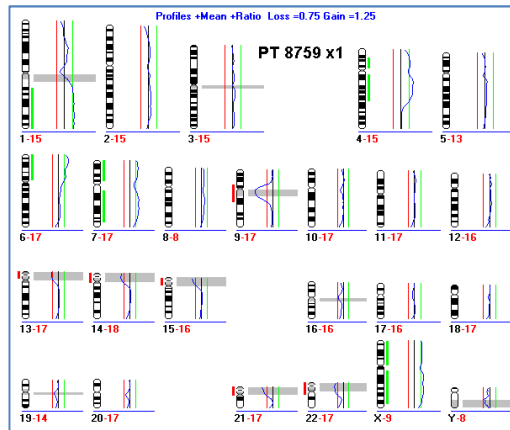
### 30 PT 04



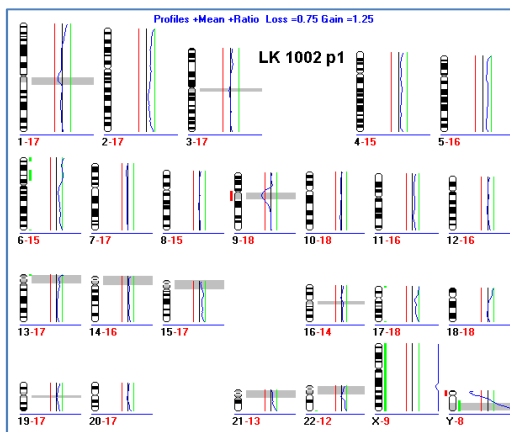
31 DTC 01



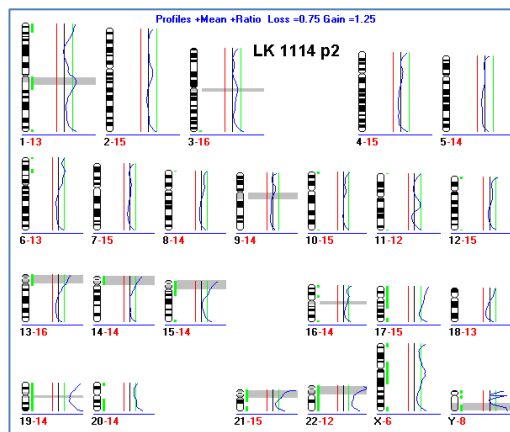
35 PT 01



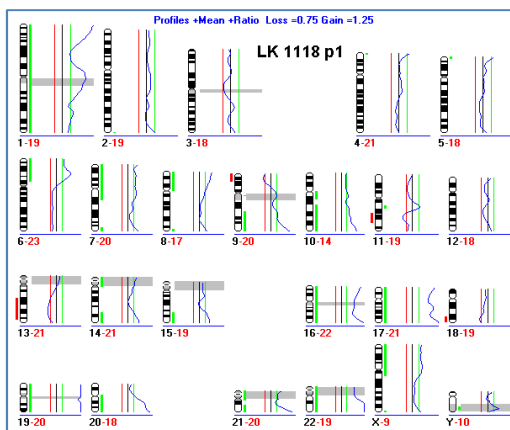
37 DTC 01



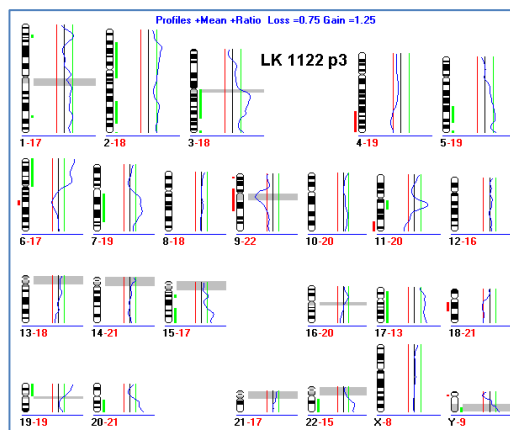
43 DTC 01



44 DTC 01

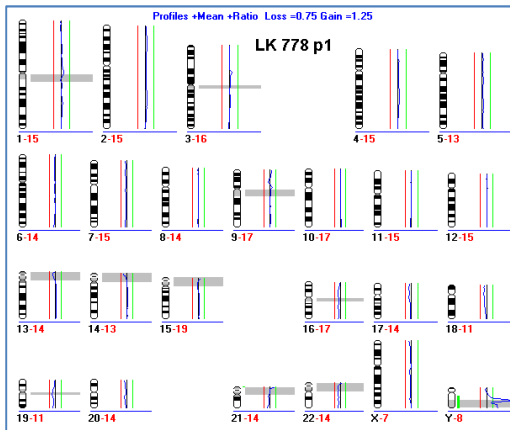


46 DTC 03

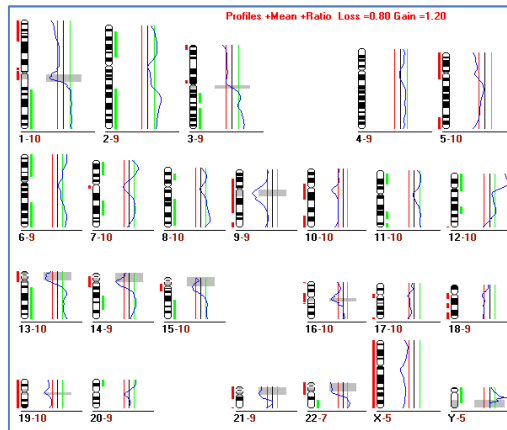


## 10. Anhang

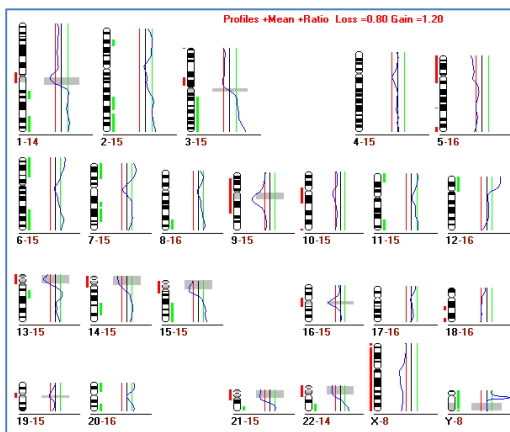
### 48 DTC 01



### 51 Met 01

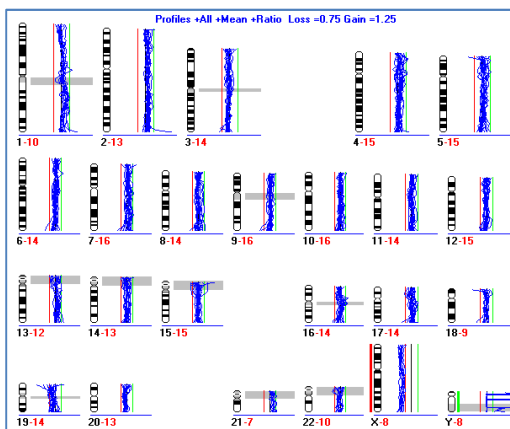


### 51 Met 02

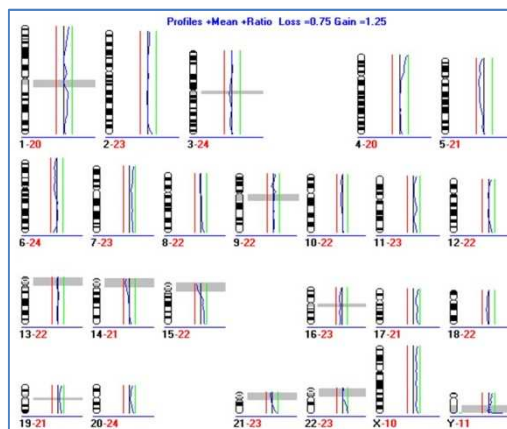


## 10.3.3 CGH-Profil der Kontrollen

### Areal Normalzellenpool 1



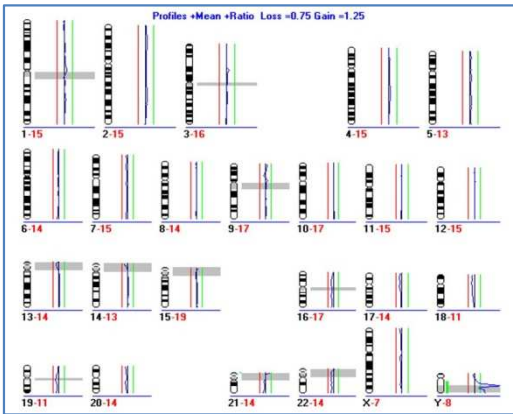
### Areal Normalzellenpool 2



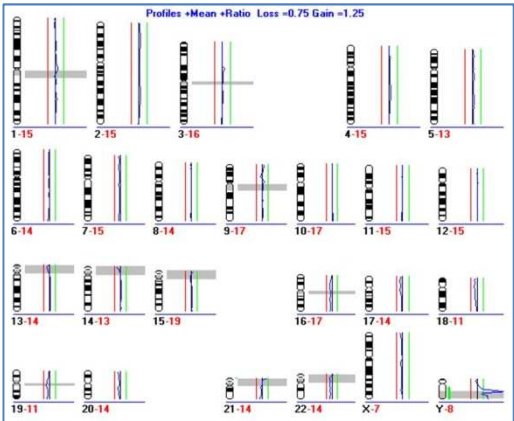


10. Anhang

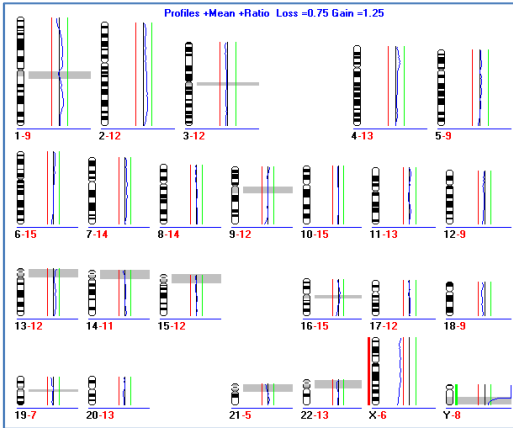
SLN 778 NZ 1



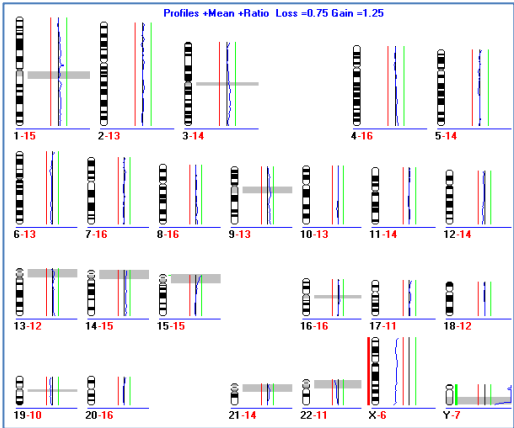
SLN 778 NZ 2



SLN 1032 NZ 1



SLN 1032 NZ 2



SLN 1077 NZ 1

